



# ACTA PHYSIOLOGICA SCANDINAVICA

VOL. 3



## REDACTORES

*Y. REENPÄÄ*  
*Helsinki*

*A. KROGH*  
*Kjöbenhavn*

*E. LANGFELDT*  
*Oslo*  
(EDITOR)

*G. LILJESTRAND*  
*Stockholm*

## COLLABORANTES

G. AHLGREN (Lund), Y. AIRILA (Helsinki), E. L. BACKMAN (Uppsala),  
G. BLIX (Uppsala), J. BOCK (Kjöbenhavn), R. EGE (Kjöbenhavn),  
H. v. EULER (Stockholm), U. S. v. EULER (Stockholm), A. FÖLLING  
(Oslo), R. GRANIT (Stockholm), G. GÖTHLIN (Uppsala), E. HAMMARSTEN  
(Stockholm), E. HANSEN (Kjöbenhavn), K. HANSEN (Oslo), E. HOHWÜ-  
CHRISTENSEN (Stockholm), G. KAHLSON (Lund), F. LEEGAARD (Oslo),  
J. LEHMANN (Göteborg), J. LINDHARD (Kjöbenhavn), E. LUNDGAARD  
(Kjöbenhavn), K. MÖLLER (Kjöbenhavn), R. NICOLAYSEN (Oslo), S. ØR-  
SKOV (Aarhus), A. V. SAHLSTEDT (Stockholm), F. SCHÖNHEYDER (Aarhus),  
P. E. SIMOLA (Helsinki), T. TEORELL (Uppsala), H. THEORELL (Stockholm),  
T. THUNBERG (Lund), A. WESTERLUND (Uppsala), E. WIDMARK (Lund),  
A. I. VIRTANEN (Helsinki)

---

1941—1942

*Reprinted with the permission of Acta Physiologica Scandinavica*  
*Karolinska Institutet, Stockholm*

JOHNSON REPRINT CORPORATION    JOHNSON REPRINT COMPANY LIMITED  
1 Fifth Avenue, New York, N.Y. 10003    Berkeley Square House, London, W.1



## VOL. 3. INDEX.

### Fasc. 1. (15. XI. 1941.)

	Pag.
Excretion of Phosphorus by the Bowel. By KAJ KJERULF JENSEN	1
The effect of the 1,2-Dihydroxybutyric Acids on Insulin Hypo- glycemia. By E. HOFF-JØRGENSEN and W. POSBORG PETERSEN	28
On the Anti-Histamine, Anti-Anaphylatic and Atropine-like Effects of some Xanthine Derivatives. By NILS EMMELIN, G. S. KAHLSON and KARIN LINDSTRÖM	39
Herzgrösse und Vitalkapazität bei Schwankungen der Blutver- teilung. Von SONIE JONSELL und TORGNY SJÖSTRAND	49
The Nature of the Growth-Promoting Substances in the Embryonic Tissue Juice. By ALBERT FISCHER	54
Criteria of Alcohol Intoxication in Animals in Relation to Blood Alcohol. By LEONARD GOLDBERG and TORE P. STÖRTEBECKER	71
Untersuchungen über die Wirkung von per os zugeführtem Leber- extrakt und Ventrikelschleimhaut auf die Permeabilität der roten Blutkörperchen beim normalen Menschen. Von SØREN L. ØRSKOV	82
The Action of Bile Salts on Intestinal Peristalsis. By NILS EMME- LIN	91

### Fasc. 2. (5. I. 1942.)

The Plasma Prothrombin Level in Cats and Rabbits after Ex- cluding the Liver from the Circulation, after Stimulation of the Splanchnic Nerve and after Intravenous Injection of Adrenalin. By BÖRJE UVNÄS	97
Die Wirkung von Carbaminoylcholin und Acetyl- $\beta$ -Methylcholin auf Herzminutenvolumen und Atmung des gesunden Menschen. Von L. GOLDBERG und G. LILJESTRAND	111
Potassium Interchange in the Human Body. By G. HEVESY	123
The Negative Component P <sub>III</sub> in the Retinogram of the Tortoise. By CARL GUSTAF BERNHARD	132
Colour Receptors of the Frog's Retina. By RAGNAR GRANIT	137
On the Significance of the Presso-Sensible and the Chemo-Sensible Reflexes in the Regulation of the Cardiac Output. By ERLING ASMUSSEN and E. O. E. KNUDSEN	152



	Pag.
On the Determination of the Blood Volume by the CO-Method. By EELING ASMUSSEN .....	156
On the Biological Potency of $\beta$ -Carotene in Arachis Oil and in Margarine. By E. ABRAMSON and E. BRUNIUS .....	164
Properties of Thrombokinase (Thromboplastin) from Ox Lung. By TAGE ASTRUP and SVEN DARLING .....	168
The Effect of Narcotics, Especially Barbiturates, on Salivary Secretion, Elicited through Chorda Stimulation or Parasympa- thomimethic Drugs. By N. S. BRÄHAMMAR and N. G. EMMELIN .....	182
Studies on the Muscular Physiology of the Genital Tract. III. Tonus, Spontaneous Activity and Drug Reactions in the Vaginal Muscles. By SUNE GENELL .....	185

### Fasc. 3. (16. III. 1942.)

Rate of Penetration of Ions into Erythrocytes. By L. HAHN and G. HEVESY .....	193
Untersuchungen über die periphere Blutversorgung des Herz- muskels. Von LARS ENGSTRAND .....	224
The Physical Calculation of the Cardiac Output and its Error Sources. By A. APÉRIA .....	237
Untersuchung über die biologische Wirkung der Substanz P. Von Bo GERNANDT .....	270
On the Action of the Optical Isomers of Adrianol, Corbasil, Sympa- tol and Ephedrine on Isolated Intestine. By BÖRJE EMILSSON .....	275

### Fasc. 4. (15. V. 1942.)

Experimentelle Untersuchungen über den diabetogenen Faktor des Hypophysenvorderlappens. Von ERIK LUNDBERG und STINA THYSELIUS-LUNDBERG .....	289
Über die Einwirkung von Kopulation und Abblachen auf den Blutzuckergehalt des Frosches. Von ERIK LUNDBERG und STINA THYSELIUS-LUNDBERG .....	297
Temporal Sequence of Component Potentials in the Frog's Retina and the Electrotonic Potential in the Optic Nerve. By C. G. BERNHARD .....	301
Blood Coagulation and Species Specificity of Fibrinogen. By TAGE ASTRUP and SVEN DARLING .....	311
Spectral Properties of the Visual Receptor Elements of the Guinea Pig. By RAGNAR GRANIT .....	318
Eine Farbreaktion mit Isobutyraldehyd zur kolorimetrischen Bestimmung von Valin. Von K. A. J. WRETTLIND .....	329
The Influence of Sympathicolitics on the Action of Adrenaline Substitutes on Isolated Intestine. I. By BÖRJE EMILSSON....	335

	Pag.
After Potentials in Mammalian Voluntary Muscle. By C. G. BERNHARD and U. S. v. EULER .....	351
Über die Reversibilität der Wirkungen von Kohlenmonoxyd auf die Atmung des Frosch-Sartorius. Von PER ERIC LINDAHL ...	361
De l'action de la thyroxine et du dinitrophénol sur la consommation d'oxygène chez des tétards normaux et chez des tétards narcotisés. Par JOHAN MÄRTENSSON .....	369

---

Supplementum IX. Über die Primärvorgänge bei Chemorezeptoren-Beeinflussung. Von GÖSTA EHRENSVÄRD.

Supplementum X. Studien über die Atropingruppe. Von EBBE NYMAN.

---

# INDEX AUCTORUM.

	Pag.
ABRAMSON, E., and E. BRUNICUS, Biological Potency of $\beta$ -Carotene in Arachis Oil and in Margarine .....	164
APÉRIA, A., Calculation of Cardiac Output .....	237
ASMUSSEN, ERLING, and E. O. E. KNEPSEN, Significance of the Presso-Sensible and the Chemo-Sensible Reflexes in the Regulation of the Cardiac Output .....	152
ASMUSSEN, ERLING, Determination of Blood Volume by the CO-Method .....	156
ASTRUP, TAGE, and SVEN DARLING, Properties of Thrombokinas from Ox Lung .....	168
ASTRUP, TAGE, and SVEN DARLING, Blood Coagulation and Specificity of Fibrinogen .....	311
BERNHARD, CARL GUSTAF, The Negative Component P <sub>III</sub> in the Retinogram of the Tortoise .....	132
BERNHARD, C. G., Potentials in the Frog's Retina and Optic Nerve .....	301
BERNHARD, C. G., and U. S. v. EULER, After Potentials in Mammalian Voluntary Muscle .....	351
BRUNICUS, E., and E. ABRAMSON, Biological Potency of $\beta$ -Carotene in Arachis Oil and in Margarine .....	164
BRÅHAMMAR, N. S., and N. G. EMMELIN, The Effect of Barbiturates on Salivary Secretion .....	182
DARLING, SVEN, and T. ASTRUP, Properties of Thrombokinas from Ox Lung .....	168
DARLING, SVEN, and TAGE ASTRUP, Blood Coagulation and Specificity of Fibrinogen .....	311
EMILSSON, BÖRJE, Action of the Optical Isomers of Adrianol, Corbafil, Sympatol and Ephedrine on Isolated Intestine. I. . .	275
EMILSSON, BÖRJE, Influence of Sympathicolytica on the Action of Adrenaline Substitutes on Isolated Intestine .....	335
EMMELIN, NILS, G. S. KÅHLÖN and KARIN LINDSTRÖM, Anti-Histamine, Anti-Anaphylactic and Atropine-like Effects of Xanthine Derivatives .....	39
EMMELIN, NILS, Action of Bile Salts on Intestinal Peristalsis . .	91
EMMELIN, N. G., and N. S. BRÅHAMMAR, Effect of Barbiturates on Salivary Secretion .....	182
ENGSTRAND, LOIS, Blutversorgung des Herzmuskels .....	224
EULER, U. S., and C. G. BERNHARD, After Potentials in Mammalian Voluntary Muscle .....	351

FISCHER, ALBERT, Nature of Growth-Promoting Substances in Embryonic Tissue Juice .....	54
GENELL, SUNE, Muscular Physiology of the Genital Tract. III. ..	185
GERNANDT, BO, Biologische Wirkung der Substanz P .....	270
GOLDBERG, LEONARD, and TORE P. STÖRTEBECKER, Criteria of Alcohol Intoxication in Animals in Relation to Blood Alcohol ..	71
GOLDBERG, L., und G. LILJESTRAND, Wirkung von Carbaminoylcholin und Acetyl- $\beta$ -Methylcholin auf Herzminutenvolumen und Atmung .....	111
GRANIT, RAGNAR, Colour Receptors of the Frog's Retina .....	137
GRANIT, RAGNAR, Spectral Properties of the Visual Receptor Elements of the Guinea Pig .....	318
HAHN, L., and G. HEVESY, Penetration of Ions into Erythrocytes .....	193
HEVESY, G., Potassium Interchange in the Human Body .....	123
HEVESY, G., and L. HAHN, Penetration of Ions into Erythrocytes ..	193
HOFF-JÖRGENSEN, E., and W. POSBORG PETERSEN, Effect of 1,2-Dihydroxybutyric Acids on Insulin Hypoglycemia .....	28
JONSELL, SONIE, and TORGNÝ SJÖSTRAND, Herzgrösse und Vitalkapazität bei Schwankungen der Blutverteilung .....	49
KAHLSON, G. S., NILS EMMELIN and KARIN LINDSTRÖM, Anti-Histamine, Anti-Anaphylactic and Atropine-like Effects of Xanthine Derivatives .....	39
KJERULF JENSEN, KAJ, Excretion of Phosphorus by the Bowel ...	1
KNUDSEN, E. O. E., and ERLING ASMUSSEN, Significance of the Presso-Sensible and the Chemo-Sensible Reflexes in the Regulation of the Cardiac Output .....	152
LILJESTRAND, G., and L. GOLDBERG, Wirkung von Carbaminoylcholin und Acetyl- $\beta$ -Methylcholin auf Herzminutenvolumen und Atmung .....	111
LINDAHL, PER ERIC, Reversibilität der Wirkungen von Kohlenmonoxyd auf die Atmung des Frosch-Sartorius .....	361
LINDSTRÖM, KARIN, NILS EMMELIN and G. S. KAHLSON, Anti-Histamine, Anti-Anaphylactic and Atropine-like Effects of Xanthine Derivatives .....	39
LUNDBERG, ERIK, und STINA THYSELÍUS-LUNDBERG, Diabetogener Faktor des Hypophysenvorderlappens .....	289
LUNDBERG, ERIK, und STINA THYSELÍUS-LUNDBERG, Einwirkung von Kopulation und Abbläichen auf den Blutzuckergehalt des Frosches .....	297
MÄRTENSSON, JOHAN, Action de la thyroxine et du dinitrophénol sur la consommation d'oxygène .....	369
POSBORG PETERSEN, W., and E. HOFF-JÖRGENSEN, The Effect of the 1,2-Dihydroxybutyric Acids on Insulin Hypoglycemia ....	28
SJÖSTRAND, TORGNÝ, and SONIE JONSELL, Herzgrösse und Vitalkapazität bei Schwankungen der Blutverteilung .....	49
STÖRTEBECKER, TORE P., and LEONARD GOLDBERG, Criteria of Alcohol Intoxication in Animals in Relation to Blood Alcohol ..	71

	Pag.
THYSELICUS-LUNDBERG, STINA, und ERIK LUNDBERG, Diabetogener Faktor des Hypophysenvorderlappens .....	289
THYSELICUS-LUNDBERG, STINA, und ERIK LUNDBERG, Einwirkung von Kopulation und Abbläichen auf den Blutzuckergehalt des Frosches .....	297
UVNÄS, BÖRJE, Plasma Prothrombin Level after Excluding the Liver from the Circulation, after Stimulation of the Splanchnic Nerve and after Intravenous Injection of Adrenalin .....	97
WETTLIN, K. A. J., Farbenreaktion zur kolorimetrischen Bestimmung von Valin .....	329
ØRSKOV, SØREN L., Wirkung von Leberextrakt und Ventrikelschleimhaut auf die Permeabilität der roten Blutkörperchen ..	82

\*\*\*\*\*

## Excretion of Phosphorus by the Bowel.

By

KAJ KJERULF-JENSEN.

(Received 17 June 1941.)

---

Considerable amounts of phosphorus are constantly excreted with the faeces. In the adult about 0.5 g or about  $\frac{1}{3}$  of the total amount of phosphorus excreted normally leaves the body with the faeces, while  $\frac{2}{3}$  are excreted through the kidneys. In rats this varies very much according to the composition of the food administered. Usually about half of the excreted phosphorus is found in the faeces.

The absolute quantities of phosphorus excreted with urine and faeces and also the ratio between these two figures under varying circumstances have been most carefully determined. The phosphorus of the faeces, however, represents partly non-absorbed phosphorus from the food, and partly phosphorus originating from the organism itself. The endogenous fraction of the faecal phosphorus is mainly derived from non-reabsorbed digestive secretions and from desquamated epithelia of the gut. It has, however, also been discussed whether a controlled excretion of phosphorus takes place in the gut in such a manner that the excretion in the bowel contributes towards a regulation of the phosphorus content of the organism. Such a controlled secretion of phosphorus into the intestine has never been proved and neither does it seem likely that it exists. In this connection it must be borne in mind that an increase in the absolute quantity of endogenous faecal phosphorus following increased administration of phosphorus cannot be regarded as a sign of a controlled excretion to the bowel. As endogenous and exogenous phosphorus in the intestinal contents are subject to the same variations in absorptive effectiveness, an increase in the phosphorus offered (exogenous phosphorus) will cause a decrease in reabsorption of endogenous phosphorus if the

amount of phosphorus reabsorbed is fairly constant, the absolute amount of endogenous phosphorus in the faeces will therefore rise although it is not correct to say that the increase is the result of a controlling mechanism. Only if the endogenous fraction of phosphorus reaches a figure which is higher than the figure resulting from dilution with exogenous phosphorus, may the increase be considered an indication of a controlled phosphorus excretion into the bowel.

It was a great help to the evaluation of the endogenous faecal phosphorus fraction when the administration to rats of a diet poor in phosphorus or completely without phosphorus was introduced. OSBORNE, MENDEL and PARK (1923) were the first to describe a diet very poor in phosphorus for the investigation of rickets. NICOLAYSEN (1937) used a diet poor in Ca and P for vitamin-D-deficient rats and the corresponding control animals. In both groups of rats the coecum had been removed prior to the experiments, which made it possible to cut down the experimental period to four days. The endogenous phosphorus excretion determined in this manner varied between 1.0 and 2.1 mgs in 24 hours in the vitamin-D-deficient animals and 0.75—1.35 mgs in the controls (young, growing rats). This may presumably be considered a minimum excretion of endogenous phosphorus into the bowel, as in NICOLAYSEN's experiments conditions were extremely favourable for an effective absorption, a considerable ratio of the phosphorus which had been secreted into the bowel presumably having been re-absorbed. Furthermore, NICOLAYSEN was able to prove that a rise in the calcium contents of the ingesta increased the faecal loss of phosphorus from the body. As early as 1924 TELFER demonstrated that almost the total phosphorus content of the food may be lost with the stools if calcium in the food is increased very much. Besides calcium other cations such as Sr, Mg, Ba, Pb, and Fe may combine with phosphate in the bowel; if administered in excessive amounts they may give rise to low-phosphorus rickets.

As may be seen, it is possible to determine the endogenous excretion of phosphorus fairly accurately during phosphorus inanition; but hitherto it has not been possible to evaluate the endogenous excretion of phosphorus in the faeces in cases where the food contains normal or larger than normal quantities of phosphorus. If considerable amounts of phosphorus are added to a diet otherwise poor in phosphorus, considerable amounts are also

excreted with the faeces, as shown by SHELLING (1932) and DAY and McCOLLUM (1939). These authors have, however, not been able to decide how much an increase in endogenous phosphorus contributes to the large amounts of phosphorus present in the faeces under these circumstances. It was therefore an important advance when HEVESY, HAHN and REBBE (1939) used a radioactive phosphorus isotope for this purpose. The method suggested and the theory upon which it is based are in themselves fairly simple. Some days after radioactive phosphorus ( $^{32}\text{P}$  has a suitable half life period for this purpose) has been introduced into the organism — by mouth or parenterally — the fraction which has not been excreted is — on account of the considerable dynamic powers of phosphorus — fairly evenly distributed among the various phosphorus compounds of the organism. As it must be supposed that most of the phosphorus excreted through the kidneys as well as that excreted through the digestive tract has passed the plasma, the activity/mg P is probably the same for plasma-P, urinary P and P in the digestive secretions. If the radioactive phosphorus excreted with the digestive secretions is diluted with inactive, non-absorbed phosphorus from the food the activity/mg P in the faeces decreases in comparison with activity/mg P in plasma. As a measure of the specific activity<sup>1</sup> of plasma the specific urinary activity has been used.

$$\frac{\text{Activity/mg P in the faeces}}{\text{Activity/mg P in the urine}} \times 100$$

thus gives the percentage of the faecal phosphorus which originates from the organism itself. This method was used on a few cases, and it was found that in normal rats about 40 per cent. of the faecal P was of endogenous origin. In a healthy, adult woman a single determination showed 20 per cent. of faecal P to originate from the organism.

In the paper quoted — cfr. also HEVESY and HAHN (1940) — a possible source of error is also mentioned, which may play a part when labelled phosphorus is used for the evaluation of endogenous faecal phosphorus: the incorporation of labelled phosphorus within the different organic phosphorus compounds of the organism takes place with greatly varying velocity, depending partly upon the rate with which phosphorus diffuses through the cell-membranes, partly on the intensity of synthesis of the phosphorus compounds in question. In agreement with the above, incorporated, labelled phosphorus is again given off at

<sup>1</sup> Specific activity = Activity/mg P.



greatly varying rates, and certain organic phosphorus compounds, particularly phosphatides and nucleoproteides keep their phosphoric acid radical comparatively long (HEVESY and ATEN, 1939); in this way such phosphorus compounds which may occur in the faeces, are able to show higher specific activities than those corresponding to the acid-soluble plasma-P, namely specific activities corresponding to those of plasma-P some days previously. In order to obtain as even a distribution as possible of the labelled phosphorus administered, it is advantageous to make the interval between activation and the experiment as long as possible.

### Author's own Investigations.

As mentioned above the method for determining endogenous faecal phosphorus suggested by HEVESY, HAHN and REBBE is based on the assumption that the specific activity of urinary phosphorus parallels that of the digestive secretions. In the present work an attempt has been made at a further illumination of this assumption through a comparison of the specific activity of urinary phosphorus and the specific activity of faecal phosphorus from an organism (rat) on a phosphorus-free diet poor in calcium. If the above presumption is correct these two values should be very close to one another, as the possibility of dilution of the secreted, active phosphorus by inactive phosphorus from the food is excluded. An error besides those mentioned may, however, originate from a prolonged sojourn of faeces in the colon, so that samples of urine and faeces, voided simultaneously are not truly comparable, as they have not been formed simultaneously.

*Technique of phosphorus determinations and measurements of activity.* When the activity of faecal samples is to be measured we are often dealing with fairly large quantities of material with a comparatively low activity. For practical reasons the ashing of the faecal samples was initiated by heating on the sand-bath to about 300° C. for several hours, whereby the greater part of the organic substance was destroyed; in this manner the further ashing was considerably shortened; it was carried out on a smaller part of the dry powder gained by the process as described above by careful heating with sulphuric acid and fuming nitric acid. Phosphorus was determined on aliquots of the ashed material by colorimetric determination after the modified method of Jendrassik.

To aliquots of the ashed material, which were to be used for the determination of activity, inactive sodium phosphate was added; and by precipitation as ammonium magnesium phosphate a precipitate was obtained, which consisted of both active and inactive phosphate in a quantity (about 100 mgs) which can easily be transferred to an aluminium dish and placed in a Geiger-Müller counter, which latter had been modified for the determination of  $\beta$ -particles emitted by the radio-phosphorus.

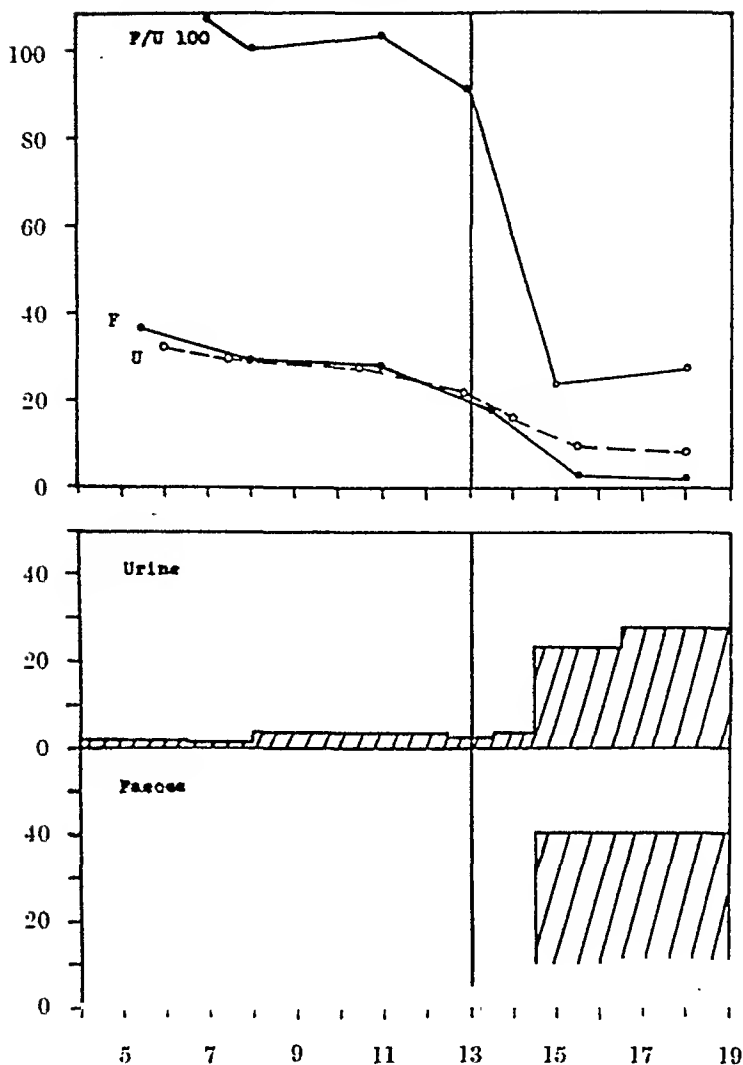


Fig. 1. (Upper part).

Specific activity (activity/mg P) of urinary and faecal total phosphorus in a rat, activated by injection of radioactive sodium phosphate. The vertical line indicates the change from a P-free diet poor in Ca to ordinary, phosphorus-containing food.

Ordinate: Activity/mg P.

Abscissa: Time in days, after the introduction of labelled phosphorus.

U: Urine.

F: Faeces.

FU:  $\frac{\text{Activity/mg P of faecal P}}{\text{Activity/mg P of urinary P}} \times 100$ .

Ordinate of FU curve: Per cent.

(Figure below).

Excretion of phosphorus through urine and faeces in rat No 1.

The black area indicates the calculated fraction of endogenous faecal phosphorus.

Ordinate: mgs P per 24 hours.

Abscissa: Time in days after the introduction of labelled phosphorus.

*Experiment No 1.*

2 Rats, Weight: 163 and 164 g, were during the whole experimental period given a P-free diet extremely poor in Ca of the following composition:

Powdered sugar: 93 per cent.

Agar: 4 » »

Salts (P-free): 2 » »

P-free vitamins (Vitamin D, carotin, thiamine, nicotinic acid) (cfr. NICOLAYSEN (1937)).

After 10 days the same amounts of radioactive sodium phosphate ( $^{32}\text{P}$ ): about 150,000 units ("Kiek") were injected subcutaneously on both rats. In the true experimental period: On the 4th—13th day after the injection, urine and faeces were collected separately and total phosphorus and activity were determined in simultaneously excreted samples of both. It is presumed that during the 10 + 4 days prior to the experiment proper the bowels have been completely emptied of their original, inactive phosphorus compounds.

(Fig. 1, 1st part).

*Experiment No 2.*

2 Rats, Weight: 180 and 184 g, were thoroughly activated by subcutaneous injection of about 200,000 units of radioactive sodium phosphate on each animal 2 weeks before the experimental period. The rats were then given a phosphorus free diet poor in calcium. After a preparatory period of 10 days total phosphorus and its specific activity were determined in urine and faeces for 6 days.

(Fig. No 2. 1st part).

*Experiment No 3.*

In order to find out whether it is possible to determine endogenous faecal phosphorus in humans with radioactive phosphorus in the manner suggested by HEVESY, HAHN and REBBE, the author chose to determine the activity/mg P of total phosphorus in the urine and in the bile-pancreatic juice gathered through a duodenal tube in 4 adult patients with affections which are of no significance in this connection. The activity/mg P of total faecal phosphorus was determined simultaneously. Prior to these determinations about 300,000 units of radioactive sodium phosphate ( $^{32}\text{P}$ ) had been administered by mouth or subcutaneously.

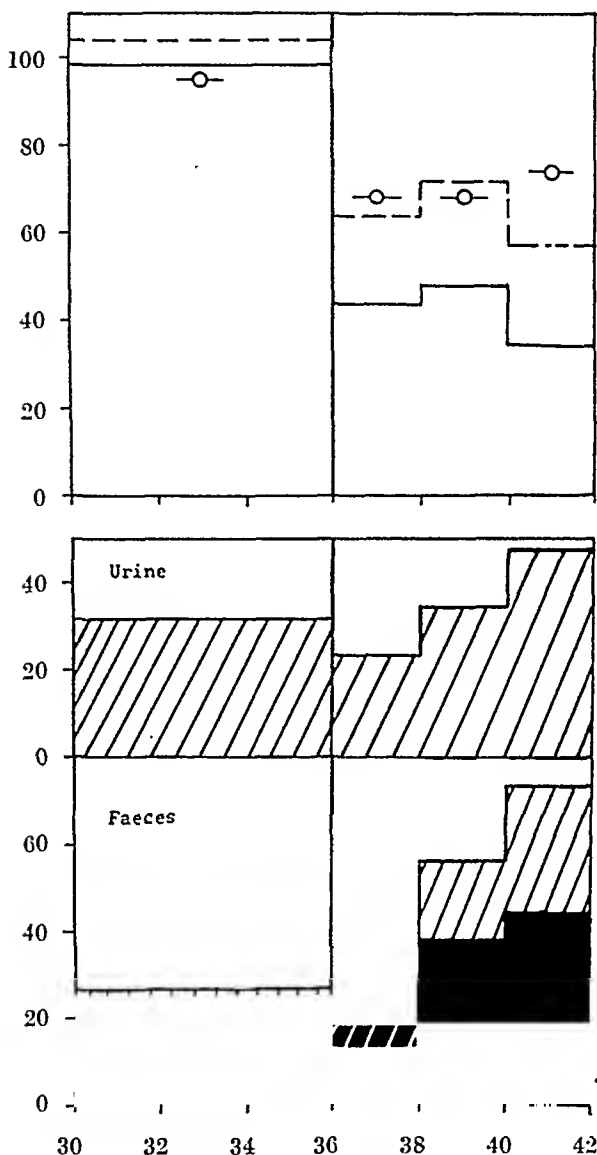


Fig. 2. (Upper part).

Specific activity (activity/mg P) of urinary P and faecal P in rat No 3, activated by injection of radioactive sodiumphosphate.

The vertical line indicates the change from a P-free diet, poor in Ca to the same diet plus 10 mgs P per 24 hours, given as secondary sodium phosphate.

Ordinate: Activity/mg P.

Abscissa: Time in days after the introduction of labelled phosphorus.

---: Urine.

—: Faeces.

—o—o—:  $\frac{\text{Activity/mg P of faecal phosphorus}}{\text{Activity/mg P of urinary phosphorus}} \times 100$ .

(The ordinate is here given in per cent.)

(Figure below.)

Total excretion of phosphorus to urine and faeces in rat No 3. The black area indicates the calculated fraction of endogenous faecal phosphorus.

Ordinate: mg P per 24 hours.

Abscissa: Time in days after the introduction of labelled phosphorus.

Table No 1.

*The ratio between the activity of total phosphorus in the urine and in the bile-pancreatic juice of four adult humans at different intervals following the administration of labelled phosphorus.*

Experimental case No	1	2	3	4
Date of samples (days after administration of labelled P.) . . . . .	5	6	11	31
Activity/mg P of bile sample Activity/mg P of urine $\times 100$ . . . . .	84	98	96	99

### Discussion of Experimental Results.

(Experiments Nos. 1, 2 and 3.)

Experiments Nos. 1 and 2 (figs 1 and 2, 1st parts) show that labelled phosphorus, when administered to 4 normal rats on a P-free diet, was excreted in urine and faeces with almost the same specific activity of urinary and faecal total phosphorus, with a parallel fall in these values. The faecal samples sometimes showed a slightly greater specific activity than the urinary samples voided at the same time. As mentioned above, this may to a certain extent be due to the faecal samples having been formed at an earlier time when the specific activity of both urinary and faecal phosphorus was higher. In this connection it seems justifiable therefore to compare the faecal samples with the urinary samples of the previous day.

Experiment No 3 which deals with the excretion of labelled phosphorus in the bile-pancreatic juice of 4 adults, showed that already one week after the administration of the labelled phosphorus the specific activity of the total phosphorus in samples of bilepancreatic juice was very nearly of the same value as the specific activity of urinary phosphorus. It may therefore be considered justifiable to look upon the specific activity of urine as indicating the specific activity of at any rate that fraction of the faecal endogenous phosphorus which originates in the digestive secretions.

If these results are used as a starting point, it is possible by using labelled phosphorus as indicator and by the help of the values:

$$\frac{\text{Activity/mg P of faecal P}}{\text{Activity/mg P of urinary P}} \times 100$$

to calculate the endogenous phosphorus excretion to the faeces (in percentage of faecal P) in animals (rats) as well as in humans. It is necessary to let pass several days between administration of the labelled phosphorus and collection of the urinary and faecal samples for analysis.

### Experiments to Determine the Amount of Endogenous Faecal Phosphorus.

The method for determination of endogenous faecal phosphorus suggested above has been used in the following experiments for the purpose of gaining information concerning the percentage of endogenous faecal phosphorus when phosphorus is administered with the diet. The experiments include rats and humans and form a direct continuation of the preliminary experiments described above.

#### *Experiment No 4 (Fig. 1).*

2 Rats, weight: 160 and 164 g, were thoroughly activated by subcutaneous injection of 150,000 units of radioactive phosphorus on each animal. The rats were given a P-free diet (as in experiment No 1) for 10 days before and 13 days after the injection; from the 13th to the 19th day they were fed an ordinary food mixture containing 1 per cent. phosphorus and 0.54 per cent. calcium. The excretion of total phosphorus and of radioactive phosphorus in the urinary and faecal samples collected were determined as described above.

In the period during which the rats were fed a P-free diet the specific activity of the urinary and the faecal phosphorus was almost of the same value, admixture with inactive food phosphorus being excluded. Following the feeding of a diet containing phosphorus there was a marked fall in the specific activity of faecal P as compared with the specific activity of urinary P, indicating that the active endogenous phosphorus had been diluted with non-absorbed, inactive phosphorus from the food. As the values for both rats were very close only the results from rat No 1 have been entered on the figure.

#### *Experiment No 5 (Table No 2).*

4 adult persons, living on an ordinary, mixed diet were examined. Their body phosphorus was labelled by the administration of about 300,000 units of radioactive phosphorus; urine and faeces were

collected in various periods after the labelled phosphorus had been introduced. Total phosphorus and activity of the urinary and faecal samples were determined in the manner described above. The fraction of the faecal phosphorus which had the same specific activity as the urinary phosphorus excreted simultaneously, is called endogenous phosphorus, whilst the remaining faecal phosphorus is called exogenous phosphorus. The various results are referred in table No 2. Further the calculated, average quantity of endogenous phosphorus in the faeces has been entered, partly in terms of mgs P, partly in per cent. of the total quantity of faecal phosphorus.

Table No 2.

Experimental case No.	1	2	3	4
Period in which samples were collected (days after administration of labelled phosphorus)	5-11	6-9	8-18	30-34
Average mg total P in urine per 24 hours . .	980	820	505	1,050
Average mg total P in faeces per 24 hours . .	457	617	370	338
(Average calculated quantity of endogenous faecal P in per cent of total faecal P)				
Activity/mg P in faeces				
Activity/mg P in urine $\times 100$ . . . . .	24.8	25.0	27.5	31.0
Calculated, average quantity of endogenous faecal phosphorus. Mg P per 24 hours . . . . .	105	138	93	102

### Discussion of Experimental Results (Experiments Nos 4 and 5).

The most important observation made in experiment No 4 on rats was that it was possible to dilute the endogenous, active faecal phosphorus with exogenous food phosphorus and that the dilution was indicated by a fall in the specific activity of the faecal phosphorus. Direct determination of phosphorus in the faeces of 4 rats on a P-free diet poor in Ca showed the excretion of endogenous phosphorus to be on an average 1.7 mgs per 24 hours. Following administration of an ordinary food mixture containing phosphorus, the endogenous phosphorus of faeces during a few days rose to 11.6 and 14.8 mgs per 24 hours respectively.

The determinations on humans showed that on an ordinary mixed diet non-absorbed food phosphorus amounts to about  $\frac{3}{4}$  of the total faecal phosphorus; the endogenous faecal phosphorus

was on an average 27 per cent. or 109 mgs per 24 hours out of an average total faecal excretion of 446 mgs P per 24 hours. In humans the fraction of the endogenous phosphorus excreted with the faeces was only about  $\frac{1}{10}$  of the total amount of endogenous phosphorus excreted (urinary P + endogenous faecal P) (8.9, 9.7, 14.4, and 15.6 per cent. respectively).

It was, however, necessary to demonstrate that the increase in endogenous faecal phosphorus observed in experiment No 4 might also be brought about if the possibility of phosphorus being bound to the intestinal contents (e. g. because of a large amount of Ca in the food or because of large quantities of bulky ingesta) has not been increased.

*Experiment No 6* (Fig. No 2, period after administration of P-free Diet).

In this experiment the value of endogenous faecal phosphorus was examined on a diet which did not contain noteworthy quantities of phosphorus-binding substances (e. g. Ca), and in which phosphorus was only present in an easily absorbable form (sodium phosphate).

2 rats, weighing 180 and 184 g, were thoroughly activated by subcutaneous injection of about 200,000 units of radioactive sodium phosphate on each animal 3 weeks before the true experimental period. Following a preliminary period of 16 days during which the rats were fed a P-free diet poor in Ca, an addition of 10 mgs P per 24 hours as secondary sodium phosphate was given for a period of 6 days. At the same time total phosphorus and activity in the collected urine and faeces were determined.

Increased excretion of active (endogenous) phosphorus in the faeces following an increased administration of phosphorus was also clearly seen in this experiment, in which phosphorus was introduced as easily absorbable inorganic phosphorus, just as in experiment No 4, in which it was introduced as a mixture of organic and inorganic phosphorus compounds of the food.

*Other studies on the excretion of endogenous faecal phosphorus in normal rats:*

The experiments registered in table No 3 show the figures for endogenous faecal phosphorus (determined with labelled phosphorus) in 5 full grown rats with an average weight of 234 g. The rats have been fed a diet with 1 per cent. P and 0.54 per cent. Ca.



Endogenous phosphorus amounted to 38.5 — 39.0 — 40.4 — 46.0 — 55.0 per cent. respectively of the total faecal contents of phosphorus, or to 38 — 44 — 52 — 52 — 53 per cent. respectively of the total endogenous excretion of phosphorus: Urinary P + calculated endogenous P of the faeces. Thus, a rat excretes almost equal amounts of phosphorus from its organism through the kidneys and through the bowel.

Table No 3..

*The average phosphorus balance during a period of 6 days in 5 rats.*

Mg P per rat 24 hours	Mg P per 100 grammes rat per 24 hours
— — — — —, given by mouth: 72.4	— — — — —: 31.0
— — — — —, excreted in urine: 17.2	— — — — —: 7.4
— — — — —, excreted in faeces: 35.8	— — — — —: 15.3
— — — — —, retained: 19.4	— — — — —: 8.3
— — — — —, endogenous in faeces: 15.6	— — — — —: 6.8
Endogenous faecal phosphorus in per cent of total faecal phosphorus: 43.5	
Endogenous faecal phosphorus in per cent of total endogenous excretion of phosphorus (urinary P endogenous faecal P) . . . . . 47.8	
Absorbed phosphorus in per cent. of administered phosphorus . . . . 71.5	

### Experiments to Determine the True, Endogenous Excretion of Phosphorus into the Bowel.

In the experiments described above on rats it was shown that an organism, the phosphorus contents of which has been labelled with radioactive phosphorus, excretes larger quantities of radioactive phosphorus through the faeces if the amount of phosphorus offered with the food increases. In the following an attempt has been made to elucidate whether this increase in excretion of labelled phosphorus is part of a controlled excretion of phosphorus from the organism into the bowel, or only the result of a decreased reabsorption of the endogenous phosphorus that has been secreted to the bowel, due to the dilution with comparatively large quantities of inactive, non-absorbed phosphorus of the ingesta. A priori it seems rather unlikely that the quantities of phosphorus excreted with the digestive secretions should be controlled by variations in the phosphorus concentrations.

The following experiments aim at determining the total amount of endogenous phosphorus excreted to the bowel; in order to

obtain maximum figures for the excretion of endogenous phosphorus to the bowel, the diluting effect has been greatly increased by administration of very large (gradually increasing) quantities of phosphorus with the food.

*Experiment No 7 (Table 4).*

In an experiment on 2 full grown rats weighing 240 and 230 g respectively, both the Ca and P contents of the food were gradually increased by addition of increasing quantities of secondary calciumphosphate. Administration was continued until the amounts of Ca and P offered were so large that the rats stopped taking their food. 30 days before the experiment proper the rats had been activated by subcutaneous injection of 500,000 units of radioactive sodiumphosphate ( $^{32}\text{P}$ ). The experimental periods were each of 6 days duration. After a preliminary period of 6 days 500 — 1,000 — 2,000 and 4,000 mgs respectively of secondary calciumphosphate were added to the food of each rat daily during the following four periods of six days. The rats were fed twice daily for 30 minutes outside their cages, which were designed for separate collection of urine and faeces; the collected samples were analysed for total-P and activity.

The percentage of endogenous phosphorus of the faeces has been calculated according to the equation:

$$\frac{\text{Activity/mg P in faeces}}{\text{Activity/mg P in urine}} \times 100.$$

**Discussion of Results of Experiment No 7**  
(Table No 4).

The most striking observation in this experiment was the fact that the percentage of labelled phosphorus in the faeces remained unchanged in spite of the excessively large quantities of phosphorus that had passed through the intestine of the animals. In this way the calculated secretion of endogenous faecal phosphorus increased to about 3 times the initial value. If, for instance, we look at the last experiment (Rat No 2) we see that endogenous (activated) phosphorus amounts to 52 mgs in 24 hours — as the absorption percentage is 51.1 the organism must — according to this calculation — have secreted about 100 mg P to the intestinal lumen in 24 hours.

Table No 4-

(Experiment No 7.)

*Excretion of radioactive phosphorus and total phosphorus in urine and faeces in 2 rats, A and B, which had 30 days earlier been activated by the injection of radioactive <sup>32</sup>P. Experimental period: 6 days X 5. Diet: Standard food plus increasing quantities of secondary calciumphosphate.*

The figures indicate excretion per 24 hours.

	Standard food mixture		Food + sec. calcium phosphate					
	Rat A	- B	Rat A	- B	Rat A	- B	Rat A	- B
Ca/P in the food . . . . .	0.54	0.54	0.73	0.73	0.78	0.78	1.02	1.02
Urine: Activity (Kick) . . . . .	41.1	26.5	32.9	25.6	37.7	38.9	41.8	27.4
, : mgs total P . . . . .	18.8	20.8	30.8	26.7	41.4	51.5	74.6	66.9
, : Activity/mg P . . . . .	2.190	1.270	1.067	0.968	0.912	0.753	0.559	0.409
Faeces: Activity (Kick) . . . . .	31.3	15.5	14.4	14.7	26.0	19.2	22.1	21.2
, : mgs Total P . . . . .	36.6	26.9	50.5	52.9	102.5	103.3	136.0	167.3
, : Activity/mg P . . . . .	0.855	0.582	0.285	0.278	0.253	0.186	0.163	0.127
Endogenous P in faeces in per cent of faeces . . . . .	39.0	46.0	26.7	28.8	27.7	24.7	29.2	31.3
Endogenous faecal P (mgs) . . . . .	14.4	12.4	13.6	15.2	25.5	25.5	39.6	52.0
Endogenous faecal P (mgs) per 100 grammes rat per 24 hours . . . . .	6.0	5.4	5.6	6.6	10.6	11.1	16.6	22.5
Phosphorus balance:								
mgs P administered by mouth . . . . .	75.5	74.0	96.3	93.0	159.2	158.0	235.4	235.0
mgs exogenous P in faeces . . . . .	22.2	14.5	36.9	37.7	77.0	77.8	96.0	115.0
Absorbed phosphorus (mgs) . . . . .	53.3	59.5	59.4	55.3	82.2	80.2	139.4	120.0
Endogenous faecal + urinary phosphorus (mgs) . . . . .	33.2	33.2	44.4	41.9	66.9	76.0	114.2	118.9
Retained phosphorus (mgs) . . . . .	20.1	26.3	15.0	13.4	15.3	4.2	25.2	1.1
Absorbed phosphorus in per cent. of quantity administered . . . . .	70.4	80.4	61.9	59.7	51.6	51.0	59.2	51.1

## Deposition of Excreted, Labelled Phosphorus in the Intestine by Administration of Calcium with the Food.

*Experiment No 8 (Tables Nos 5 a, 5 b, 5 c).*

In order to determine how far the calcium introduced with the food is able to deposit the phosphorus secreted by the organism into the intestinal lumen the endogenous excretion of phosphorus with the faeces was determined by means of radioactive phosphorus in 3 full grown rats. The rats were first fed known quantities of an ordinary mixed diet with 0.58 per cent. calcium and 1 per cent. phosphorus and afterwards the same diet with an addition of calciumlactate, 100 mgs to each rat for 6 days, the ratio Ca/P being increased to 0.84. 14 days previously each rat had been activated by subcutaneous injection of 160,000 units <sup>32</sup>P. Urine and faeces were collected during periods of 6 days and analysed for activity and total phosphorus:

Table No 5 a.

*Endogenous phosphorus of faeces, given in mg per 24 hours and in per cent of total faecal phosphorus.*

Ca/P of diet		0.54		0.84	
Rat No.	Rat. Weight	Endogenous P (%)	-mg P per 24 hours	—(%)	-mg P per 24 hours
1	220	38.5	14.3	27.2	13.5
2	200	40.4	16.0	28.5	13.3
3	280	55.0	20.8	29.4	19.7
Average		44.5	17.0	31.7	15.5

Table No 5 b.

*Phosphorus absorbed — given as mg P per 24 hours and as absorbed phosphorus in per cent of the quantity of phosphorus administered.*

Ca/P of diet		0.54		0.84	
Rat No.	Absorbed P (%)	-mg P per 24 hours	—(%)	-mg P per 24 hours	
1	64.8	42.1	45.7	30.7	
2	63.6	41.6	48.9	31.8	
3	78.0	61.3	57.0	39.5	
Average	68.8	48.3	50.5	34.0	

Change in percentage:  $\div 30$ .

Table No 5 c.

*Phosphorus balance. The figures indicate mg P per 24 hours.*

Ca/P in the diet	Rat No 1		Rat No 2		Rat No 3	
	0.54	0.84	0.54	0.84	0.54	0.84
Mg P, given by mouth . . . . .	65.2	66.8	65.4	65.4	78.3	70.0
Exogenous P, mgs in faeces . .	23.1	36.1	23.8	33.6	17.0	30.5
Mg P, absorbed . . . . .	42.1	30.7	41.6	31.8	61.3	39.5
Endogenous P in faeces, mgs + mg P in urine . . . . .	27.6	31.9	30.6	28.2	39.9	35.7
Mg P retained . . . . .	+14.5	-1.2	+11.0	+3.6	+21.4	+3.8

### Determination of the Phosphorus Concentration of Bile-Pancreatic Juice in Rats.

#### *Experiment No 9.*

In order to obtain an idea of the phosphorus concentration of the digestive secretions the phosphorus concentration of samples of bile-pancreatic juice was determined in 6 normal rats (weighing about 200 g). A tube was placed in the duodenum on a level with the opening of the bile duct and the intestine tied on both sides close to the tube. The anaesthetic used was Amythal, 3.4 cg per kg given into the muscle. In these experiments a rat secreted on an average about 1 ml of bile-pancreatic juice per hour.

The average phosphorus concentration in the bile-pancreatic juice of rats was:

P determined directly (inorganic):	3.9	mgs	per	100	ccm.
Acid-soluble P (total):	10.3	»	»	»	»
Total P:	25	»	»	»	»

### Discussion of Experimental Results.

A comparison between the observations in experiments Nos 7 and 8 leads to the conclusion that the considerable excretion to the faeces of labelled phosphorus following the administration of large quantities of calcium phosphate must be considered as mainly due to the administered phosphorus and not to the calcium simultaneously introduced. It was the object of experiment No 7 to obtain maximum values for the endogenous (labelled) phosphorus excreted into the intestinal lumen by excessive dilution of endogenous phosphorus with exogenous food phosphorus.

At the same time the experiment may serve to elucidate the question whether a controlled excretion of phosphorus to the bowel takes place, an increased excretion of phosphorus being expected under these experimental conditions where very large quantities of phosphorus were administered. As mentioned above, we must demand as an unfailing criterion of a true increase in the excretion of phosphorus to the bowel that the increase in endogenous faecal phosphorus exceeds the increase caused solely by dilution with exogenous phosphorus. An increase of that size has not been observed. But at the same time the increase in absolute endogenous faecal phosphorus is very considerable. In this experiment, however, the absolute quantity of endogenous P which must have been given off to the intestinal lumen is so large that it is doubtful whether the calculated total endogenous phosphorus (excreted endogenous faecal phosphorus + calculated reabsorbed endogenous phosphorus) — about 100 mgs P per rat per 24 hours in all — can possibly have been excreted with the digestive secretions. Such an excretion must at any rate imply far larger concentrations of phosphorus in the digestive secretions than commonly observed. If we consider the concentration of total phosphorus in bile-pancreatic juice, at least 400 ml fluid are necessary for the transport of 100 mgs endogenous P to the bowel. We must therefore suppose that the considerable quantities of labelled phosphorus which in experiment No 7 passed into the bowel cannot be used as an indication of the actual quantities of endogenous phosphorus excreted.

**Further Investigations on the Relation between Endogenous Phosphorus which has Actually been Secreted into the Bowel and Labelled Phosphorus which has been given off to the Intestinal Contents.**

The use of radioactive phosphorus in experiments of the kind described above, indubitably allows a clear distinction between nonabsorbed phosphorus of the food and endogenous phosphorus in the faeces. Possible sources of error have been discussed above; the most important: the possible occurrence in the digestive secretions of organic phosphorus compounds with greater specific activity than the inorganic phosphate of the organism, may be looked upon as eliminated in experiments in which (as e. g. in exp. 7) a very long time has passed between the activation of the animal and the experimental period proper.

The exceedingly high values for endogenous faecal phosphorus found in experiment 7, however, compels us to a careful reconsideration of the following question: Are the figures for endogenous faecal phosphorus as determined by the direct method, and for endogenous phosphorus given off to the intestinal lumen, calculated with due allowance for reabsorption, an indication of the actual amount of phosphorus excreted into the bowel? For the possibility exists that labelled phosphorus, originating in the organism, is exchanged with non-labelled phosphorus, situated in the intestinal lumen. We must imagine that such an exchange of labelled phosphorus with non-labelled phosphorus takes place as an exchange of ions through the intestinal wall in itself, and that an exchange like this mainly or exclusively concerns easily diffusible phosphorus compounds (phosphate ions), and that — without increasing the quantity of the phosphorus really excreted — it would increase the specific activity of faecal phosphorus. This hypothetical process of exchange would parallel absorption. From various investigations, e. g. with radioactive phosphorus, it is well known that inorganic phosphorus, when administered in moderate doses, is most effectively absorbed; only about 4 per cent. leaves the gut unabsorbed (HEVESY, HAHN and REBBE, 1939). Phosphoric esters are also absorbed easily and effectively, depending on the rate at which they are broken down in the bowel (LASCOWSKI, 1937). Under normal conditions the easily diffusible phosphorus contents of the food are thus most effectively absorbed, and an equalisation process will be partly hidden by the fact that the greater part of the phosphate which has left the intestinal wall by diffusion is later absorbed; but if, on the other hand, the quantity of phosphate offered to the organism is abnormally large, absorption will be less complete, and the faeces will contain larger quantities of labelled phosphorus than corresponding to the true excretion of phosphorus to the gut. If the total quantity of endogenous phosphorus supplied to the intestinal lumen is calculated as the total quantity of endogenous phosphorus found in the faeces + reabsorbed endogenous phosphorus, calculated on the basis of the absorption percentage of total phosphorus, a process of exchange as discussed above will also give us an entirely false picture of the quantities of endogenous phosphorus excreted to the bowel, if the administered quantities of phosphorus are moderate. It is therefore necessary to investigate how far the intestinal mucosa as a limiting membrane between

the intestinal lumen and the organism is permeable to phosphorus towards the intestinal lumen.

The question whether phosphorus may be given off from the organism to the intestinal lumen through the mucosa of the small intestine (besides through the sputum, the gastric juice, bile and the pancreatic juice) was investigated by MAGEE and REID (1931) and by YOUNGBURG (1937): YOUNGBURG used rats, partly fed a diet free of phosphorus, partly an ordinary diet with phosphorus; both total phosphorus and phosphoric fractions were determined in the intestinal contents. From the variations found YOUNGBURG felt justified in drawing the conclusion that both inorganic P and lipid P are given off to the lumen of the intestine from the intestinal mucosa itself. MAGEE and REID found a passage of phosphorus from the intestinal wall into the intestinal lumen when absorption of sugar was taking place.

### **Description of the Author's own Experiments in Elucidation of the Hypothesis on the Exchange of Phosphate Ions through the Intestinal Wall.**

A diffusion of phosphate through the intestinal wall to the gut might possibly be demonstrated with radioactive phosphorus: For example by demonstrating active phosphorus in an isolated intestinal loop (containing a solution of phosphate) of an animal which was simultaneously injected with radioactive phosphorus of considerable activity. This procedure as well as the one described below still leaves in uncertain how much of the phosphate given off from the intestinal wall originates in secretions from the intestinal glands and how much is due to the hypothetical exchange of phosphate ions.

In the author's own experiments, described below, a different procedure was used: Rats were anaesthetised with Amytal and an isotonic solution with a known concentration of sodium phosphate of known (low) activity/mg P was introduced into isolated intestinal loops. The proportional decrease of active and inactive phosphorus in the loop was examined. The calculation was carried out as follows: The activity/mg P of introduced solution was known; at the end of the experiment the activity and the remaining quantity of inorganic phosphorus ( $P_0$ ) were determined, from which figures the activity/mg P was known. The absolute decrease in activity must be due to absorption and must be directly proportional to the absorbed quantity of phosphorus; the fraction of the remaining, inorganic quantity of phosphorus, originating from the solution administered, is calculated from:



$$\frac{\text{Act/mg P of sol. at end of exp.}}{\text{Act/mg P of sol. administered}} \times P_0 \text{ (sol. at end of exp.)}.$$

The difference between this quantity and the inorganic phosphorus of the solution at the end of the experiment must indicate phosphorus which has been admixed from the organism by secretion or diffusion.

By both procedures described the phosphorus contents of the secretions formed in the glands of the intestinal wall will be a source of error. If such experiments were to prove an exchange of phosphate ions through the intestinal mucosa the calculated amount of phosphorus carried to the gut must substantially exceed the quantities of phosphorus which can be imagined to have been carried only with the intestinal gland secretion into the segment in question.

#### *Experiment No 10 (Table No 6).*

In a fasting rat (No 7, weight 160 g) the upper and lower half of the small intestine were tied off. An isotonic aqueous solution, containing NaCl and a mixture of primary and secondary phosphate ( $p_H$  7.3) with a phosphate concentration of 0.09 mgs per ccm, was introduced into the duodenum and the upper and lower parts of the intestine, 1, 2 and 2 ccm respectively. After 30 minutes the greater part of the injected solution had been absorbed, particularly in the duodenum, where absorption is by far the most rapid. The remaining contents of the intestinal segments in question were removed and analysed for inorganic P and activity.

#### *Experiment No 11 (Table No 6).*

Rat No 8 (Weight 152 g). The procedure was the same as in experiment No 10, except that in the present case the sample

Table No 6.  
Experiment Nos 10 and 11.

	Intestinal segment	Mgs $P_0$ of remaining solution	Act/mg P of remaining solution in per cent. of act/mg P of solution introduced	Quantity absorbed in per cent. of P of solution administered
Rat No 7	Duodenum	0.030	2.2	99.6
	Jejunum	0.043	24.0	94.3
	Ileum	0.229	25.0	68.5
Rat No 8	Duodenum + Jejunum	0.030	5.4	94.0
	Ileum	0.221	43.0	58.4

from the duodenum and the upper segment of the intestine were taken in one. The activity/mg P of the solution introduced was: 390 units. The calculated dilution of the active phosphorus introduced during 30 minutes is seen in the following table No 6.

On account of the very effective absorption, dilution of the introduced, active phosphorus with inactive phosphorus was less certain, as the remaining quantities were very small. The experiment was therefore repeated with a solution which was absorbed more slowly.

*Experiment No 12 (Table No 7).*

A fasting rat (No 9 weight 180 g) was given 2 ccm of an aqueous solution, composed as follows, into the duodenum, the jejunum and the ileum: P, mgs per ccm 0.166, Activity (units)/mg P 58.4, Fructose, per cent. 4.0.

The introduced fluid was removed again after 30 minutes, when equal quantities were reinjected — the latter being removed again after 60 minutes.

The fluids were analysed for activity and  $P_0$ .

The results are given in table No 7.

Table No 7.  
(Experiment No 12.)

Time of exchange	Intestinal segment.	Mgs $P_0$ in remaining solution	Act./mg P in per cent. of act./mg P of solution administered	Admixed inactive $P_0$ , given in mgs P and in per cent. of $P_0$ in remaining solution	
				per cent.	mgs P
30 minutes	Duodenum	0.082	57	40	0.033
	Jejunum	0.165	58	45	0.075
	Ileum	0.370	83	10	0.037
60 minutes	Duodenum	0.040	7	99	0.040
	Jejunum	0.027	36	63	0.017
	Ileum	0.250	84	16	0.040

*Experiment No 13 (Table No 8).*

In order to repeat the study the procedure was the same as in the previous experiments; and in order further to find out whether a migration of phosphate takes place through the mucosa of the stomach and the coecum (rats Nos 11, 12, 13, and 14) the digestive tract was carefully washed with Ringer solution, at a temperature

of 38° C., until the Ringer solution was clear, before the active solution was introduced. Solution introduced: Activity/mg P: 175 units (kick). 0.246 mgs P per ccm solution. Fructose: 4 per cent.

The calculated dilution of the active phosphorus introduced is seen in the following table:

Table No 8.  
(Experiment No 13.)

	Segment of digestive tract	Act./mg P in per cent of Act/mg P of solution introduced	Admixed inactive P <sub>0</sub> (given in per cent. of remaining P in solution taken for analysis and in mgs P)	
			per cent	mgs P
<i>Rat No 10.</i>				
Time of exchange: 30 minutes	Stomach	82	19	0.075
	Duodenum	74	26	0.038
	Jejunum	31	96	0.075
	Ileum	71	29	0.148
<i>Rat No 11.</i>				
Time of exchange: 30 minutes	Duodenum	62	39	0.061
	Jejunum	55	95	0.019
	Ileum	71	29	0.141
	Coecum	99	2	0.020
<i>Rat No 12.</i>				
Time of exchange: 3 hours	Coecum	69	31	0.262
<i>Rat No 13.</i>				
Time of exchange: 12 hours	Coecum	76	24	0.270

*Experiment No 14 (Table No 9).*

As small quantities of inorganic phosphate may have been present in the intestinal segments at the beginning of the experiment, this experiment was carried out as follows in order to eliminate this source of error. The whole of the small intestine (below the duodenum) of rat No 15 was washed, first with Ringer solution at about 38° C., then with a solution corresponding to the solution used in the experiment itself. The solution introduced was composed: Activity/mg P: 1,290 units (kick), 0.176 mg P per ccm. Fructose: 4 per cent. The quantity of solution introduced was

about 4 ccm (P content about 0.7 mg). The solution was removed from the intestine after 60 minutes. The results are given in table No 9.

Table No 9.  
(Experiment No 14.)

Intestinal segment	Act./mg P in per cent. of Act/mg P of solution introduced	Mg P <sub>0</sub> in remaining solution	Admixed inactive P <sub>0</sub> (given in per cent. of P <sub>0</sub> in remaining solution and in mg P)	
			per cent	mg P
Jejunum + Ileum	53	0.185	47	0.087

### Discussion of Experimental Results.

Along the whole of the small intestine (as well as the stomach and coecum) the absorption of active phosphate seems to be paralleled by an admixture of inactive phosphate, probably representing phosphate which originates from secretions formed in the glands of the intestinal wall, and probably also phosphate which has diffused through the wall of the intestine to its lumen during an exchange with corresponding quantities of phosphates diffusing away from the lumen.

The percentage of endogenous phosphorus which remains in the intestinal segments (in the present experiments inactive phosphorus) is considerable. In the experiments with the largest figures for remaining phosphorus, endogenous phosphorus was found to be about half the total quantity of phosphorus. The absolute quantities of phosphorus found in the intestinal segments at the end of the experiments were — even at their largest — very small indeed; it is therefore difficult to decide which quantitative part the admixture with endogenous phosphorus demonstrated here may have played in experiments of the kind described elsewhere in this paper; it is also difficult to decide how far the "dilution effect" observed has been due to secretion of phosphorus-containing fluids. The present experiments are by way of an orientation only; but, particularly if they are compared with the enormous quantities of endogenous phosphorus which according to experiment No 7 may be supplied to the intestinal lumen, it seems to be most likely that endogenous phosphorus may be exchanged with phosphorus lying within the lumen of the bowel through the

intestinal mucosa, and that this process may take place along the entire length of the intestinal tube. It may thus be concluded that the method described in the introduction to this paper (preliminary careful activation of the total phosphorus of the organism) may quite well be used for determinations of endogenous faecal phosphorus, and probably also for calculating the total quantity of endogenous phosphorus supplied to the lumen of the bowel, but we cannot regard these figures as an exact measure of the phosphorus which has actually been secreted to the gut. Neither can the method be considered suitable for determining if there is a controlled loss of endogenous phosphorus to the intestinal lumen. Thus the observation that the proportion between the excretion of labelled phosphorus in urine and faeces respectively remains fairly constant even if the ingested quantity of phosphorus increases by no means proves that there is a controlled excretion of phosphorus to the gut; but, on the other hand it does not exclude such a possibility. We should have had a definite criterion of such a controlled excretion of phosphorus to the bowel if distinct variations in the phosphorus contents of bile and pancreatic juice had been clearly observed. But the variations were too small to have any significance.

### Conclusion.

The method suggested by HAHN, HEVESY and REBBE allows us to determine how large a fraction of the faecal phosphorus is of endogenous origin. Taking into account the percentage of the food phosphorus absorbed and assuming that exogenous and endogenous phosphorus behave alike with regard to absorption, it is possible to evaluate the total quantity of endogenous phosphorus given off to the bowel. The figure thus arrived at cannot, however, be considered a measure of the actual quantity of phosphorus excreted to the gut. The reason for this is probably that phosphate ions and possibly other phosphorus-containing ions, are exchanged between the organs and the intestinal contents through the mucous membrane of the bowel. A passive exchange of this kind between the phosphorus of the organism and the mixture of exo- and endogenous phosphorus of the intestinal contents, independent of the secretion of phosphorus-containing compounds actually taking place into the bowel, may presumably lead to a considerable increase of the concentration of endogenous (labelled) phosphorus of the intestinal contents consequently of the faeces.

## References.

- BERGEIM, O., J. biol. Chem. 1926. *70*. 51.  
DAY, H. G., and E. V. McCOLLUM, Ibidem 1939. *120*. 268.  
HEVESY, G., L. HAHN and O. REBBE, Kgl. Danske Vidensk. Selsk. Biol. Medd. 1939. *14*. 3. 5.  
LASCOWSKI, M., Biochem. Z. 1937. *292*. 319.  
MAGEE, H. E., and E. REID, J. Physiol. 1931. *73*. 163.  
NICOLAYSEN, R., Biochem. J. 1937. *31*. 107.  
OSBORNE, T. B., L. B. MENDEL and E. A. PARK, Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y. 1923—24. *17*. 87.  
SHELLING, D. H., J. biol. Chem. 1932. *96*. 226.  
TELFER, S. V., Quart. J. Med. 1924. *17*. 245.  
YOUNGBURG, G. E., Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y. 1937. *36*. 230.
-

when phosphorus was given as ordinary mixed food phosphorus and as easily absorbable, inorganic sodium phosphate.

The fraction of endogenous phosphorus in the faeces only represents the difference between the endogenous phosphorus actually excreted and the part which has been reabsorbed in the gut. An attempt was made at obtaining maximum figures for the actually excreted endogenous phosphorus through increased dilution by administration of excessively large, increasing quantities of phosphorus to rats in which the phosphorus had been labelled with radio-phosphorus beforehand. The consequent increase in excretion of labelled phosphorus to the faeces was so surprisingly large that it seems doubtful whether the labelled phosphorus excreted with the faeces gives a true picture of the excretion of endogenous phosphorus. As an explanation of this disagreement the hypothesis is put forward that in the intestinal lumen non-labelled phosphorus may by diffusion be exchanged with the labelled phosphorus of the organism (in the intestinal wall). Such an exchange of ions may parallel absorption and would have no influence upon the quantity of phosphorus actually excreted, but upon the concentration of labelled phosphorus in the faeces.

Experiments on rats aiming at demonstrating this exchange of phosphate ions through the mucous membrane of the small intestine have shown, if not the existence, then at any rate the probability of such an exchange.

The possibility of a controlled excretion of endogenous phosphorus to the faeces is discussed; it is pointed out that the increase observed in the excretion of phosphorus following increased administration of phosphorus may be regarded as a natural consequence of the dilution of labelled phosphorus excreted to the gut with exogenous, non-labelled phosphorus of the food. The present experiments have not been able to prove a controlled excretion into the bowel, but on the other hand the experiments do not preclude this possibility.

The preparations of radioactive phosphorus used were presented to me by Professor G. HEVESY, whom I wish to thank for this present and for the kind assistance given to me at the University Institute of Theoretical Physics. I also wish to express my thanks to my chief, Professor E. LUNDSGAARD, for his valuable interest in and kind help with the present work.

rotations were  $[\alpha]_D^{20} = +8^{\circ}.8$  and  $-9^{\circ}.3$ . The dl-threo-1,2-dihydroxybutyric acid (M. P.  $74^{\circ}$  C) was resolved with quinidine (GLATTFELD and CHITRUM 1933). The specific rotations were  $[\alpha]_D^{20} = +15^{\circ}.3$  and  $-15^{\circ}.1$ .

### Methods.

In standardization of insulin by the mouse method (HEMMINGSEN 1933) it is customary to count convulsions and other specified symptoms as positive reaction. In order to avoid errors in observing these symptoms in the present study we have counted only "dead within three hours after the insulin injection".

In all experiments white male mice of stock "B" from the *Radium Centre for Jutland* were employed. They were fed on white bread and diluted milk for some days. The food was removed from the cages 20 hours before the beginning of the experiment, and 30 minutes before the injection the mice were weighed and placed each in a separate glass jar in an air thermostat at  $30^{\circ}$  C  $\pm 1^{\circ}$  C. Only mice weighing between 12 and 18 gr. were employed. All experiments were carried out between 1 P. M. and 5 P. M. From the weight the total body surface was computed as  $s = 0.114 \sqrt[3]{w^2}$ , where  $s$  = surface in sq. dm. and  $w$  = weight in gr. Injections of 0.5 ml. insulin solution pr. sq. dm. were given subcutaneously and 1.0 ml. of antidotal solution pr. sq. dm. was administered by stomach tube.

MAC KAY, CARNE and WICK (1940) have shown that sodium citrate given in the stomach to rats formed less glycogen than the free acid. In our preliminary experiments, however, we found that neutralized dl-erythro-1,2-dihydroxybutyric acid relieved insulin hypoglycemia better than the free acid. To investigate whether this was due to a slower absorption of the free acid we determined the velocity of absorption of glucose, dl-erythro-1,2-dihydroxybutyric acid and the sodium salt of this acid in neutral solution. For this purpose mice were fasted for 20 hours and then given by stomach tube 1.0 ml. pr. sq. dm. surface of a 0.5 M solution of one of these substances. The animals were killed by decapitation at different times. The gastro-intestinal tract was removed, placed in boiling water and cut into pieces. After one hour the extract was analyzed for content of the injected substance. Glucose was determined according to MILLER and VAN SLYKE (1936); dihydroxybutyric acid according to HOFF-JØRGENSEN (1940). Blinds were found from an experiment in which a solution of NaCl was given. The results of these experiments are shown in fig. 1.



From the Biochemical Institute, Aarhus University, Denmark.

## The Effect of the 1.2-Dihydroxybutyric Acids on Insulin Hypoglycemia.

By

E. HOFF-JØRGENSEN and W. POSBORG PETERSEN.

(Received 17 June 1941.)

In a previous paper (HOFF-JØRGENSEN 1941) we found that l-erythro-1.2-dihydroxybutyric acid is readily oxydized by the mammalian organism; while d-erythro- and d-threo-1.2-dihydroxybutyric acid are oxydized slowly, and l-threo-1.2-dihydroxybutyric acid not at all. It has further been shown (HOFF-JØRGENSEN 1940) that intravenous injection of dl-erythro- and d-threo-1.2-dihydroxybutyric acid in phlorhizinized dogs increased the excretion of glucose.

These results disagree with those of WEIL-MALHERBE (1938). To throw further light on the question we have investigated the effect of the four isomeric 1.2-dihydroxybutyric acids as antidotes against insulin, working on the assumption that only those substances which yield glucose are capable of overcoming insulin hypoglycemia.

### Preparations.

A crystalline preparation of insulin, containing 22 international units pr. mg. was employed. The insulin was dissolved in 0.9 % sodium chloride, which contained sufficient hydrochloric acid to make  $p_H = 3.0$ , and 0.2 % tricresole. The strongest solution contained 0.08 unit pr. ml., and each of the following solutions contained 80 % of the insulin contained in the preceding one. All solutions were stored at 1° C.

The two racemic 1.2-dihydroxybutyric acids were prepared according to BRAUN (1929). The dl-erythro-1.2-dihydroxybutyric acid (M. P. 81° C) was resolved with quinine (HOFF-JØRGENSEN 1941). The specific

Table 1.

*Number of mice killed.*

(10 mice were used in each experiment.)

Insulin		A n t i d o t e							
Dose $\Sigma$	Units pr. l.	0.5 M NaCl		0.5 M l-e-di	0.5 M d-e-di	0.5 M l-t-di	0.5 M d-t-di	0.5 M glucose	Mean weight of mice. gr.
		1	2						
10	80.0	—	—	—	—	—	—	10	15.0
9	64.0	10	10	—	—	—	—	9	13.7
8	51.2	10	9	8	—	—	—	9	16.7
7	41.0	9	8	8	8	—	7	6	14.8
6	32.8	7	7	4	6	8	7	6	14.9
5	26.2	7	8	2	3	6	5	2	14.8
4	21.0	4	6	2	1	6	2	1	13.2
3	16.8	4	2	—	2	3	1	0	15.1
2	13.4	3	3	—	—	1	—	—	12.6
1	10.7	1	1	—	—	—	—	—	15.8
0	8.7	1	0	—	—	—	—	—	15.2
Mean weight of mice. gr.		14.9		14.2	16.1	13.8	13.4	14.2	14.6

Table 2.

*Weight-distribution of the mice.*

Weight gr.	Number of mice	Number of killed	Killed %
12 $\pm$ 0.5	56	28	50
13 —	95	60	63.2
14 —	110	49	44.8
15 —	78	37	47.4
16 —	53	25	47.2
17 —	58	27	44.6
18 —	30	17	56.8

## Statistical Treatment.

In the statistical treatment it is assumed that a homogeneous population of mice is normally distributed with regard to the logarithm of the lethal dose i. e. the smallest dose sufficient to kill one particular

It appears from the chart that the absorption of the free acids is extraordinarily slow; this is presumably due to spasmodic contraction of the pylorus. In all experiments we have consequently applied solutions of the acids neutralized with NaOH. In accordance with the results given in fig. 1 and since death does not occur till at least 30 minutes after the insulin injection, glucose was administered immediately before the injection of insulin, while the other substances were administered 40 minutes before the injection in order to secure that the antidote was almost completely absorbed before the first deaths occurred in a sample.

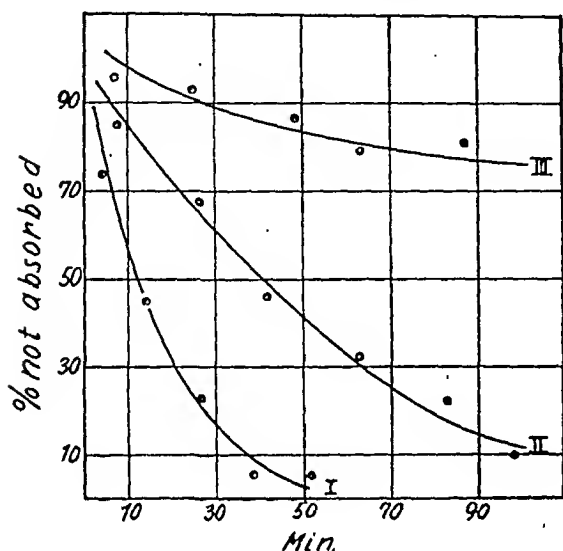


Fig. 1. Absorption of glucose (1), dl-erythro-1,2-dihydroxybutyrate (2), and dl-erythro-1,2-dihydroxybutyric acid (3).

### Experimental.

Seven series of experiments were carried out, each series comprising from five to ten experiments in each of which ten mice were given equal injections of insulin. In four of the series the four isomeric dihydroxybutyric acids were given as antidote. In one series glucose and in two series NaCl was given. The results of these experiments are given in table 1.

In all 480 mice were employed; from these 243 or 50.6 % were killed. Table 2 shows the weight-distribution of the number of killed mice in each group.

Deviations between lethality within different weight groups are small and it appears from table 1 that the variations of mean weights between different series or between different concentrations of insulin are neither large nor systematic. Consequently the selection of mice may be considered un-biassed.

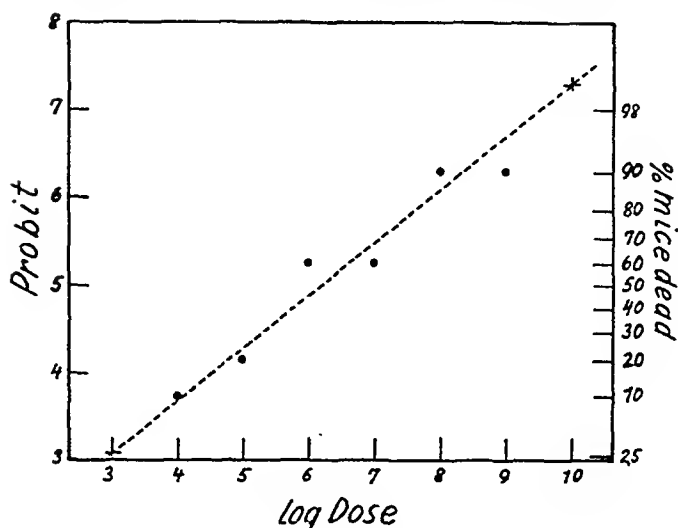


Fig. 3. Empirical probits (table 1, column 9).

against the doses, the resulting points will not fall on a straight line, cf. Fig. 3 but equation (3) may be determined by fitting a straight line to the points. This is done by the method of least squares. Since the probits are determined with unequal accuracy, appropriate weights must be applied. These are found as follows: Let the true lethality

at a given dose be  $p$ , the standard error of  $p$  is then  $\sigma_p = \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}}$ ;  $q = 1 - p$ ,  $n$  = number of animals. An experimental lethality  $p'$  will deviate from  $p$  by an error, and the corresponding probit  $y'$  will deviate from  $y$ . For small errors however  $p' - p$  will be approximately  $z$  times larger than  $y' - y$ ;  $z$  being the slope of the curve, Fig. 2, in the point  $y$ ,  $p$ . Consequently we may put

$$\sigma_{y'} = \frac{1}{z} \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}} \quad \dots \dots \dots (4)$$

In the method of least squares, the weights applied have to be inversely proportional to the variances. In the present case appropriate weights could be found as

$$w = \frac{z^2 \cdot n}{p \cdot q} \quad \dots \dots \dots (5)$$

where  $z$  can be determined by (3) when  $p$  is known;  $z$  is obviously the normal distribution, cf. (1).

In practical applications, however, we do not know the values of  $p$ , but only the empirical lethalties  $p'$ . These may simply be substituted for  $p$  in (5). In fact, this is the procedure given by GADDUM (1933).

mouse. This assumption has proved fruitful in standardization of insulin by the mouse method (HEMMINGSSEN 1933) and in several other similar fields of toxicology.

The normal distribution is given by

$$dz = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{t^2}{2}} dt \dots \dots \dots (1)$$

$$t = \frac{x - \bar{x}}{\sigma} \dots \dots \dots (2)$$

where

is the "normal equivalent deviation" of the dose in question;  $\bar{x}$  being the logarithm of the dose,  $\bar{x}$  the logarithm of the 50 % lethality dose (50 LD) and  $\sigma$  the standard deviation of the distribution.

If a large number of animals are given equal doses of insulin under similar conditions, all animals with a lethal dose smaller than the one given will die, and we shall expect to find a relative frequency of death given by the integral of the normal distribution

$$p = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^x e^{-\frac{t^2}{2}} \dots \dots \dots (3)$$

The function (3) gives the expected frequency of deaths,  $p$ , (percentage of deaths = 100  $p$ ) corresponding to any given dose (log dose =  $x$ ).

Supposing the frequency of death,  $p$ , corresponding to a given dose to be known, the corresponding value of the "normal equivalent deviation"  $t$  can be determined from (3). To avoid negative figures in the computation, Bliss (1935) has suggested to add 5 to all values of  $t$ , substituting  $y = t + 5$  for  $t$ .  $y$  expresses the dose in "probits" (probability units). Special tables of probits have been prepared by Bliss (l. c.).

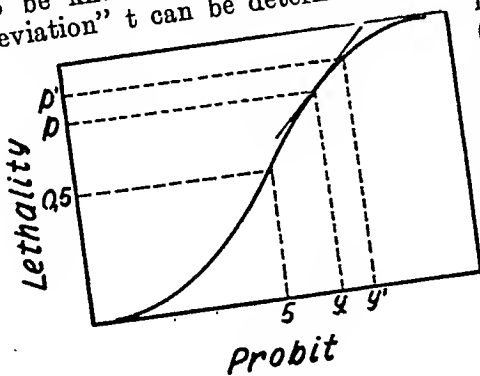


Fig. 2.

A graph of (3) is given in fig. 2, where  $p$  is plotted against  $y$ . If instead of the frequencies,  $p$ , we plot the "probits",  $y$ , against  $x$ , evidently a straight line will result, cf. (2).

The purpose of the statistical treatment is to determine this linear function, which in turn determines (3) and the values of  $\bar{x}$  and  $\sigma$ . From a series of experiments we find several observed frequencies of death  $p'$  corresponding to different doses. These frequencies are subject to random errors, and do not agree with the expected frequencies,  $p$ . When the above mentioned tables Bliss (l. c.) are entered with the values of  $p'$ , and the corresponding probits,  $y'$  are found and plotted

Table 3.

*Computations on the experimental results shown in table 2, column 9.*

Dose x	No of mice n	Deaths %	Empirical probit y'	Provisional probit y''	Working probit Y	Weight w
10	10	100	—	7.24	7.59	0.92
9	10	90	6.28	6.64	6.19	2.38
8	10	90	6.28	6.08	6.26	4.05
7	10	60	5.25	5.50	5.24	5.81
6	10	60	5.25	4.90	5.25	6.34
5	10	20	4.16	4.32	4.21	5.32
4	10	10	3.72	3.74	3.73	3.36
3	10	0	—	3.16	2.75	1.80

The equation of the straight line may be written

$$Y' = \bar{Y} + b(x - \bar{x}) \quad \dots \quad (7)$$

and the parameters are determined as

$$\bar{x} = \frac{\sum xw}{\sum w}; \quad \bar{Y} = \frac{\sum Yw}{\sum w}$$

$$b = \frac{\sum (x - \bar{x})(Y - \bar{Y})w}{\sum (x - \bar{x})^2 w} = \frac{B}{A}; \quad \text{where } A = \sum x^2 w - \bar{x} \sum xw \quad \text{and}$$

$$B = \sum xYw - \bar{x} \sum Yw$$

from (7) the logarithm of the 50 LD is found by inserting  $Y' = 5$ .

Further we find the square sum of deviations

$$\chi^2 = \sum (Y - Y')^2 w = C - bB$$

$$\text{where } C = \sum (Y - \bar{Y})^2 w = \sum Y^2 w - \bar{Y} \sum Yw.$$

The weights being the reciprocals of the variances of probits, the distribution of the square sums of deviations should be that of the Pearsonian  $\chi^2$  for a number of degrees of freedom two less than the number of experiments, if the underlying assumptions are correct. A test of these assumptions may therefore be carried out by investigating, whether the experimental values of  $\chi^2$  fall within reasonable limits for random fluctuations. In all cases the values of  $\chi^2$  were well within these limits, consequently the variance of  $b$  may be put at

$$\sigma_b^2 = \frac{1}{A}$$

An improvement of the method, however, has been developed by BLISS (1935) according to whom a preliminary line is fitted by some convenient method to the empirical probits  $y'$  as found from  $p'$ . From this line provisional probits  $y''$  are found corresponding to the doses applied. The values  $y''$  are taken as a first approximation to the unknown "true" values  $y$ , and are used in determining weights cf. (5). Finally a straight line is fitted to the empirical probits  $y'$  as above. A further refinement of this procedure was suggested by R. A. FISHER (cf. Appendix to the above mentioned paper by BLISS). From the preliminary line probit values  $y''$  are determined corresponding to doses applied in all experiments including such in which the experimental lethality was 0 or 100 %. Remembering that the error of an empirical lethality is approximately  $z$  times larger than that of a corresponding probit, we may put

$$p' - p'' = z (Y - y'') \quad \therefore \dots \dots \dots (6)$$

$p''$  being the lethality corresponding to  $y''$ .

If in this equation we insert  $p' = 1$  (100 % lethality) or  $p' = 0$  (0 % lethality) and the preliminary probit  $y''$  corresponding to the dose in question, we find a fictitious probit  $Y$  of finite value, which may be included in the further computation. Thus it is possible to utilize the material in full, including experiments in which none or all of the mice survived.

R. A. FISHER (1938) has further recommended to apply (6) for correction of all empirical probits and has prepared a table to facilitate the computation necessary. This final method has been followed in the present study. The procedure applied to each series of experiments may be summarized as follows:

From each experiment the empirical lethality  $p'$  is found. For all values of  $0 < p' < 1$  the corresponding probits are taken from Table IX (FISHER and YATES) and a chart is drawn, in which the probits are plotted against the logarithms of the respective doses, cf. Fig. 2. A preliminary straight line is fitted by hand (cf. dotted line in fig. 3). From this line provisional probits  $y''$  are read corresponding to all different doses applied. By means of  $p'$  and  $y''$  the working probits,  $Y$ , are found from Table XI (FISHER and YATES) cf. formula (6). The same table gives weighting coefficients,  $\frac{z^2}{p \cdot q}$ , which multiplied by  $n$  gives the weights,  $w$ , cf. (5). Applying these to the working probits  $Y$  a straight line is finally fitted by the method of least squares. The computation may be arranged as shown below in table 3.

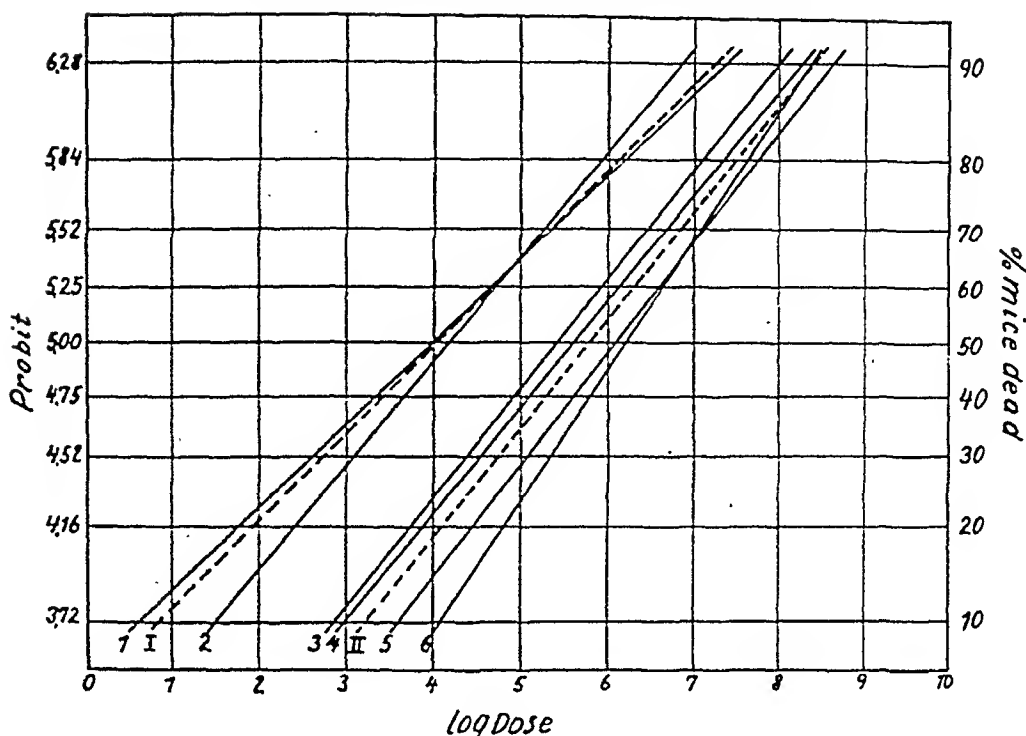


Fig. 4. Regression lines for the experiments of table 2 and 3.

l-threo-1,2-dihydroxybutyric acid (1); NaCl (2); d-threo-1,2-dihydroxybutyric acid (3); d-erythro-1,2-dihydroxybutyric acid (4); l, erythro-1,2-dihydroxybutyric acid (5) and glucose (6).

Fig. 4 seems to indicate that the slope of the regression lines increases with the effect of the antidote examined, but the differences between the slopes of the lines are not statistically significant cf. table 4. We have tried a test, however, by dividing all series of experiments into two groups; the first comprising the series in which NaCl or l-threo-1,2-dihydroxybutyric acid was given, the second comprising the four remaining series. A single regression line was determined for each of these groups by the method described cf. the two dotted lines in fig. 4. The slope of I is  $b = 0.391 \pm 0.044$  and that of II is  $b = 0.500 \pm 0.064$ . The difference is thus  $0.109 \pm 0.078$ . Though this difference is not significant either, it may indicate a real difference, in accordance with the assumption that a given quantity of antidote will neutralize an approximately constant quantity of insulin whatever dose is applied. If that is the case, the regression functions should not be straight lines but slightly curved. A decision of this question, however, would require a much larger number of animals.



and that of the probit  $Y'$ , found from (6) corresponding to log dose  $x$ , at

$$\sigma_{Y'}^2 = \frac{1}{\Sigma W} + \frac{(x - \bar{x})^2}{A}$$

the variance of the logarithm of the 50 LD is found from

$$\sigma_{x_{50LD}}^2 = \frac{1}{b^2} \left( \frac{1}{\Sigma W} + \frac{(x - \bar{x})^2}{A} \right).$$

The results of these computations of six different regression lines are given in table 4.

Table 4.

*Constants of regression lines.*

	NaCl	l-t-di	d-t-di	l-c-di	d-c-di	Glucose
$\bar{x}$ . . . . .	4.25	3.99	5.15	6.04	5.18	6.24
$\bar{Y}$ . . . . .	5.10	4.92	4.86	4.96	4.78	5.03
$b$ . . . . .	0.38	0.48	0.50	0.51	0.49	0.60
50 LD . . . . .	3.99	4.16	5.43	6.11	5.63	6.20
$\chi^2$ . . . . .	3.54	1.03	1.32	1.83	2.59	2.19
$\sigma_b$ . . . . .	0.05	0.15	0.15	0.15	0.16	0.10
$\sigma_{50 LD}$ . . . . .	0.28	0.40	0.40	0.39	0.41	0.30
50 LD <sup>1</sup> . . . . .	0.010	0.011	0.014	0.017	0.015	0.017

It appears that in case of glucose and three of the four dihydroxybutyric acids, the antidotal effects is statistically significant, the difference between 50 LD in these experiments and in that with NaCl being larger than twice the standard error. The differences between the effect of these three acids and the effect of glucose in the same molar concentration is not significant. This may indicate that the antidotal effect of these acids is larger than that of the maximum quantity of glucose, which may be derived from them.

Of the four acids, l-threo-1.2-dihydroxybutyric acid only, has shown no significant antidotal effect.

<sup>1</sup> Units insulin pr. sq. dm. surface.

## On the Anti-Histamine, Anti-Anaphylactic and Atropine-like Effects of some Xanthine Derivatives.

By

NILS EMMELIN, G. S. KAHLSON and KARIN LINDSTRÖM.

(Received 18 June 1941.)

---

The discovery of thymoxyethyldiethylamine (BOVET and STAUB 1937, STAUB 1939) represents a remarkable progress in the search for substances antagonizing the effect of histamine. As has been shown by MINARD and ROSENTHAL (1939) this substance renders smooth muscles (intestine, uterus, bronchi) insensitive to histamine (Hi). In animals previously treated with this substance bronchoconstriction cannot be induced through injection of histamine, neither does antigen elicit a bronchoconstriction in sensitized guinea pigs which have been treated with this substance. Thymoxyethyldiethylamine reduces or abolishes the depressor effects of small histamine doses in dogs, whereas the fall in blood pressure caused by big doses of histamine is not interfered with. The use of this substance in experimental work on animals and in therapeutics is limited by its toxicity. Thymoxyethyldiethylamine did not at all or only slightly diminish the contractions of the guinea pig's small intestine, caused by acetylcholine, barium chloride or potassium chloride (ROSENTHAL and MINARD 1939).

In this paper it will be demonstrated that some xanthine derivatives exert an anti-histamine and anti-anaphylactic effect similar to that of thymoxyethyldiethylamine. Xanthine, theobromine, caffeine, theophyllin and theophyllin-mono-ethanolamine have all of them these effects. We especially examined this last substance.

### Summary.

By experiments on mice it is shown that d- and l-erythro- and d-threo-1.2-dihydroxybutyric acid are effective in preventing death from insulin hypoglycemia. This supports the hypothesis that these acids may yield glucose in the metabolism. l-threo-1.2-dihydroxybutyric acid on the contrary is without effect.

The neutral solutions of the dihydroxybutyric acids are absorbed much more readily than the free acids.

The statistical treatment of the experimental results may indicate that an antidote against insulin neutralizes approximately the same quantity of insulin whatever insulin dose is applied.

We are indebted to Mr. O. STRANGE-PETERSEN, who has called our attention to the method of BLISS and FISHER, and given valuable advice on the statistical treatment.

### References.

- BLISS, C. J., *Ann. appl. Biol.* 1935. 22. 134.  
BRAUN, G., *J. Amer. chem. Soc.* 1929. 51. 228.  
FISHER, R. A., and YATES, *Statistical tables*, London 1938.  
GADDUM, J. H., *Med. Res. Coun. Spec. Rep. Ser. no. 183*. 1933.  
GLATTFELD, J. W. E., and J. W. CHITTUM, *J. Amer. chem. Soc.* 1933. 55. 3663.  
HEMMINGSSEN, A. M., *Quart. J. Pharm. Pharmacol.* 1933. 6. 39.  
HOFF-JØRGENSEN, E., *Hoppe-Seyl. Z.* 1940. 266. 56.  
—, *Ibidem* 1941. 268. 194.  
MAC KAY, E., H. O. CARNE and A. N. WICK, *J. biol. Chem.* 1940. 133. 59.  
MILLER, B. F., and D. D. VAN SLYKE, *Ibidem* 1936. 114. 583.  
WEIL-MALHERBE, H., *Biochem. J.* 1938. 32. 1033.
-

experiment performed on a strip of intestine proved that the animal was anaphylactic.

The anti-histamine and the anti-anaphylactic effects of theamin can be demonstrated immediately after the injection of theamin and persist during at least one hour; we did not extend the observations any further.

Fig. 2 shows an anaphylactic bronchoconstriction in a guinea pig not protected by theamin.



Fig. 2. Bronchial tone in a guinea pig sensitized to horse serum. At  $\uparrow$  0.1 cc. horse serum injected intravenously.

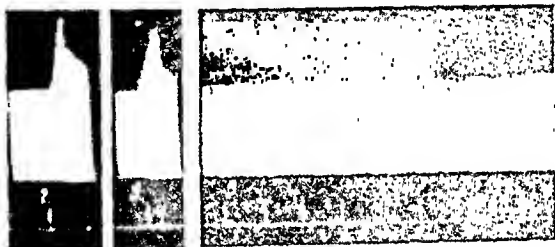


Fig. 3. Guinea pig anesthetized with urethane. At 1 and 4 acetylcholine hydrochloride (10  $\gamma$ ) was injected intravenously. At 2 and 5 both vagi were stimulated electrically in the neck and at 3 theamin (10 mg.) was administered intravenously.

The *atropine-like* effect of theamin is demonstrated in fig. 3. In the first section of the tracing the bronchoconstrictions caused by acetylcholine (1) and by electric stimulation of the cut vagi (2) are seen. After theamin (3) both these stimuli (4 and 5) are without any effect on the bronchial muscles.

Experiments of the above-mentioned type were performed on 20 guinea pigs, 3 dogs and 6 cats. In dogs and cats histamine or vagus stimulation did not cause bronchoconstriction if one of the xanthine derivatives had been administered previously. Doses of 10–15 mg. per kg. body weight were effective in antagonizing such quantities of histamine or such vagus stimuli which otherwise strongly contract the bronchi. If the histamine doses or vagus stimuli were excessively big, greater quantities of xanthine derivatives were necessary in order to abolish entirely the constrictor effects.

Experiments on anaphylaxis were not performed on dogs or cats.

## Experimental.

### Bronchial Muscles.

We experimented on dogs, cats and guinea pigs. The bronchial tone was registered continuously by KONZETT and RÖSSLER's method as used by us in previous experiments (EMMELIN, KAHLSON and WICKSELL 1941). In order to eliminate the difficulties in registering the bronchial tone caused by the spontaneous breathing after injections of xanthine derivatives an open pneumothorax was arranged by means of a big hole in the chest. In dogs the phrenic nerves were cut. In dogs and cats chloralose was used as an anesthetic; the guinea pigs were narcotized with urethane except in the anaphylactic experiments, where they were decerebrated since narcotics are said to inhibit the histamine contraction of smooth muscles (L. FARMER 1938) or to inhibit the liberation of histamine in anaphylaxis (KATZ, FREY and FREY 1939). In the experiments on anaphylaxis guinea pigs were sensitized to egg albumin or horse serum by injecting the antigen 2—3 weeks previous to the actual experiment.

The *anti-histamine* and *anti-anaphylactic* effect of theophyllin-mono-ethanolamine (theamin<sup>1</sup>) is demonstrated in fig. 1, where the

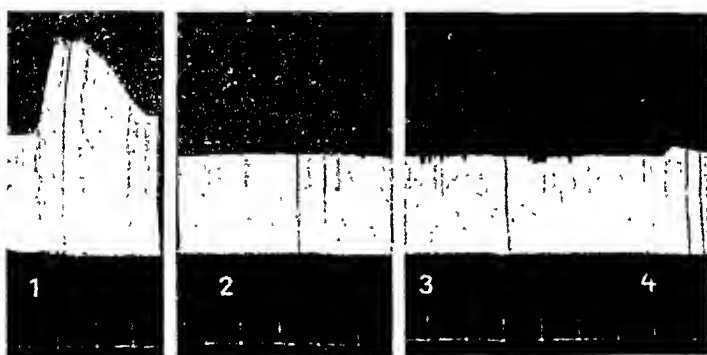


Fig. 1. Guinea pig, decerebrate. Bronchial tone continuously registered. At 1 histamine (1.5  $\gamma$ ), at 2 theamin (10 mg.), at 3 antigen (horse serum 0.1 cc.) and at 4 histamine (1.5  $\gamma$ ); all injections intravenous. Time in minutes.

bronchial tone in a decerebrate guinea pig is registered continuously. The sensitivity of the bronchi to histamine was tested by injecting 1.5  $\gamma$  histamine base intravenously at 1. Theamin — at 2 — (10 mg. intravenously) has no effect of its own on the bronchial tone. Antigen (3) as well as histamine (4) injected after theamin<sup>2</sup> does not cause bronchoconstriction. DALE-SCHULTZ'

<sup>1</sup> In U. S. A. theophyllin-mono-ethanolamine is used as a therapeutic agent under the name of theamin.

If xanthine derivatives are added to the bath in concentrations which antagonize the histamine contraction only to a certain degree, the response on adding antigen is also reduced to a corresponding degree. This observation strongly supports the view that the contraction in DALE-SCHULTZ' experiment is caused by the liberation of histamine. An experiment of this type is shown in fig. 5, each section of which represents an individual strip of ileum. In the first section 1 marks the response of the gut to 0.03  $\gamma$  histamine. At 2 and 3 horse serum is added to the bath. It will be seen that after the first shock response at 2 the gut is desensitized at 3. It will also be seen that 0.03  $\gamma$  histamine at 1 and 0.01 cc. horse serum at 2 cause contractions of the same size. The second piece of gut contracts to 0.03  $\gamma$  histamine at 4. Theamin (1 : 2,000 in the bath) is added at 5. This concentration in the bath is not sufficient to antagonize completely the effect of 0.03  $\gamma$  histamine added at 6. It is striking that the DALE-SCHULTZ' response at 7 is reduced in the same proportion by the subliminal concentration of theamin.

These effects of xanthine derivatives on the intestine are easily eliminated by removing the drug from the bath. Before 8 in fig. 5 the bathing fluid was changed to pure Tyrode's solution. The sensitivity to histamine returns immediately as seen from the response to 0.03  $\gamma$  histamine at 8.

In DALE-SCHULTZ' experiment the gut may remain contracted if the suspending fluid is not renewed. If a xanthine derivative is added to the bath the anaphylactic shock contraction can be released. An experiment of this type is seen in fig. 6.

All the examined xanthine derivatives exert anti-histamine and anti-anaphylactic effects on the intestine. The lowest concentration which perceptibly antagonizes histamine is of the order 1 : 2,500.

On the guinea pig's small intestine xanthine derivatives in concentrations of the order 1 : 1,000 cause slight contractions.

In a series of experiments on the cat's isolated small intestine we found that the xanthine derivatives antagonized histamine as they did in the guinea pig.

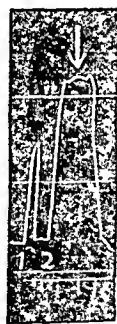


Fig. 6. Strip of ileum from a guinea pig, sensitized to horse serum. After testing the sensitivity to histamine (0.02  $\gamma$ ) at 1, antigen is added at 2. The gut remains contracted since the suspending fluid is not renewed. At  $\downarrow$  theamin is added, giving a concentration of 1 : 1,000 in the bath.

Xanthine derivatives do not regularly or significantly influence the bronchial tone as far as our experience goes. In some experiments we have observed a slight relaxation. All the investigated xanthine derivatives exerted anti-histamine, anti-anaphylactic and atropine-like effects on the bronchial muscles.

### Intestine and Uterus.

It is well known that isolated strips of guinea pig's small intestine contract if histamine is added to the bath or if antigen is allowed to act on strips from the intestine of a previously sensitized animal (DALE-SCHULTZ' experiment 1910, 1913). In fig. 4 the anti-histamine and anti-anaphylactic effects of theo-

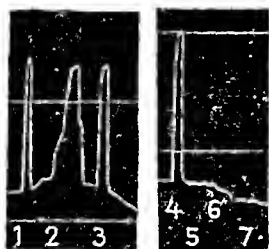


Fig. 4. Each section of the figure represents a strip of ileum from a guinea pig sensitized to horse serum. The Tyrode's solution (2 cc.) was renewed when the contractions were maximal. 1 and 3 are the responses to 0.03  $\gamma$  histamine added to the bath. 2 is the response to 0.01 cc. horse serum. The other strip of intestine contracts on adding 0.03  $\gamma$  Hi at 4. Secondary to theocin (1:1,500 at 5) horse serum (0.01 cc.) at 6 and Hi (0.03  $\gamma$ ) at 7 do not cause any contractions.



Fig. 5. Each section corresponds to a strip of guinea pig's ileum previously sensitized to horse serum. 1 = 0.03  $\gamma$  Hi, 2 and 3 horse serum (0.01 cc.). 4 = 0.03  $\gamma$  Hi. At 5 theocin is added, giving 1:2,000 in the bath. 6 = 0.03  $\gamma$  Hi, 7 = horse serum (0.01 cc.). The theocin is removed from the bath by washing. 8 = 0.03  $\gamma$  Hi.

phyllinsodium acetate (theocin) is demonstrated on the guinea pig's ileum. Each section of the tracing represents a separate piece of gut from the same animal. The Tyrode's solution in the bath was always renewed when the contraction was maximal. In the first part of the tracing histamine (1, 3) as well as antigen (3) elicits contractions. In the second part the gut is first shown to be sensitive to histamine (4) and theocin is then added to the bathing fluid (5). Under the influence of theocin the gut proves to be insensitive to histamine (7) as well as to antigen (6), to which the animal was anaphylactic.

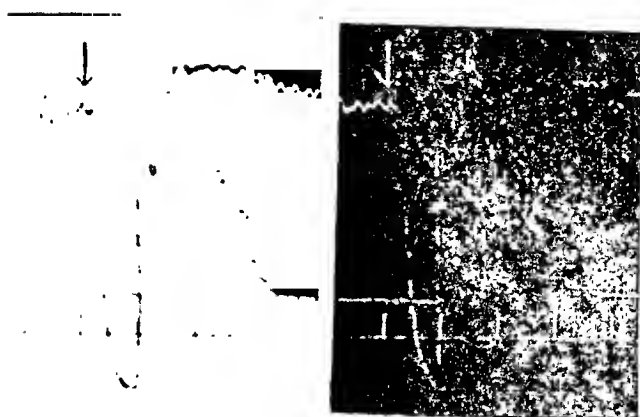


Fig. 9. Dog under chloralose. Blood pressure, intestinal activity and time in minutes. At ↓ the right vagus was stimulated electrically in the neck during 30 seconds. Before the second section of the tracing theamin (15 mg. per kg.) was injected intravenously.

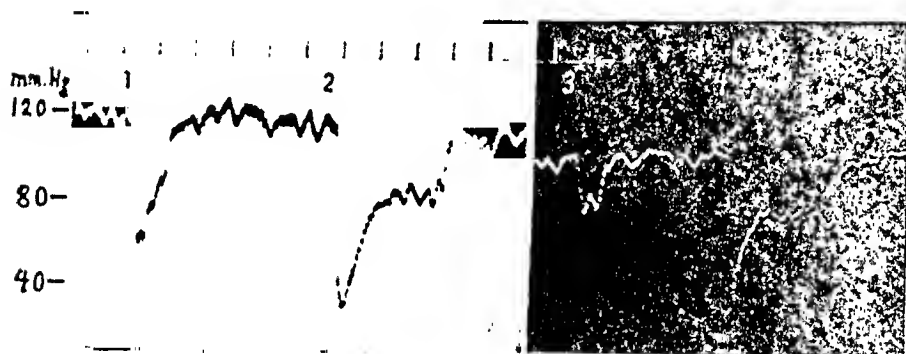


Fig. 10. Cat under chloralose. The arterial blood pressure is registered. 1 and 3 represents the fall in blood pressure caused by intravenous injections during 3 minutes of histamine 1.8  $\gamma$  per kg. and minute. The fall in blood pressure at 2 and 4 is caused by 5  $\gamma$  histamine per kg. and minute, injected during 3 minutes. Theamin (15 mg. per kg.) was injected intravenously before 3.

### Blood Pressure Responses.

After injections of xanthine derivatives the fall in blood pressure in dogs and cats caused by histamine is reduced but not abolished. The depressor affect of small histamine doses is more antagonized than the effect of bigger doses. This is obvious from fig. 10. Fig. 7 shows the fall in blood pressure in a dog, caused by a big dose of histamine. In this experiment the depressor effect of histamine is only very slightly diminished by theamin.

The depressor effect of strong vagus stimulation is not reduced by theamin, as is shown in fig. 9.



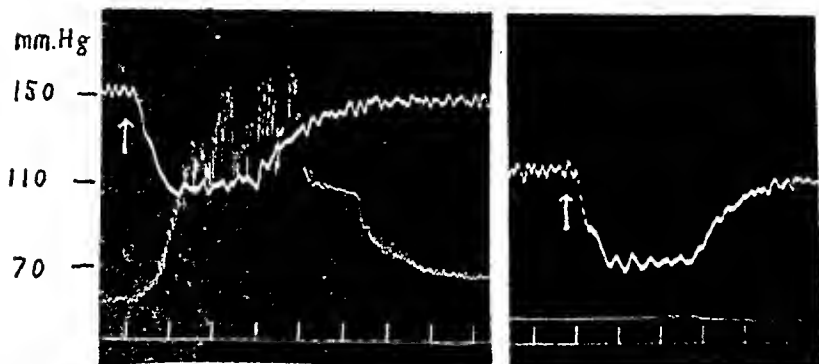


Fig. 7. Dog under chloralose. Blood pressure, intestinal activity and time in minutes are registered. Between the two sections of the figure theamin (15 mg. per kg.) was injected intravenously. The arrows mark the beginning of histamine-injections, 5.8  $\gamma$  per kg. and minute during 3 minutes.

We also performed some experiments on the dog's intestine *in situ*. A rubber balloon was inserted in the upper jejunum and connected with a water manometer. Fig. 7 represents an experiment of this type. Histamine was injected intravenously during



Fig. 8. Guinea pig's ileum suspended in 2 cc. Tyrode's solution. 1 = 0.5  $\gamma$  acetylcholine hydrochloride. At 2 theamin is added giving 1 : 1,000 in the bath. 3 = 0.5  $\gamma$  acetylcholine.

3 minutes at a constant rate. As will be seen from the first part of fig. 7 histamine augments the tone and the rhythmic contractions. The second part of the tracing shows the effect of histamine after theamin; there is no motor response.

The atropine-like effect of theamin is shown in fig. 8. On this piece of gut theamin alone elicits an unusually big motor response (2). Acetylcholine is added at 1. Theamin causes a transient contraction (2). When the bathing solution contains theamin in a proportion of 1 : 1,000 the gut is practically insensitive to acetylcholine (3).

It is well known that the motor response of the small intestine on vagus stimulation is not abolished by atropine. It is interesting that also in this respect the xanthine derivatives resemble atropine. In fig. 9 stimulation of the dog's cut vagus strongly augments the motor activity of the gut. As will be seen from the figure this motor effect persists also after theamin.

In a series of experiments on the guinea pig's uterus we demonstrated that the xanthine derivatives antagonize the motor effect of histamine.

its full activity. (The onset of the histamine-contraction is very rapid, whilst the anti-histamine effect of the xanthines develops somewhat slower.)

C) Lungs from guinea pigs, previously sensitized to horse serum or egg albumin, were perfused with Tyrode's solution. Injections of antigen into the perfused lung cause liberation of histamine from the lung (BARTOSCH, FELDBERG and NAGEL 1932, 1933). In a series of experiments we demonstrated that the liberation of histamine from the lung is not inhibited if the perfusion fluid contains xanthine derivatives in anti-anaphylactic concentrations.

The liberation of histamine from the skin in anaphylactic reactions was recently studied by the authors (1941). Applying the procedures described in that paper, we have demonstrated that the liberation of histamine from the skin in the antigen-antibody reaction is not interfered with if the skin is soaked in anti-anaphylactic concentrations of xanthine derivatives.

A. From the facts reported under B and C we conclude that the anti-histamine and anti-anaphylactic effects of the xanthines are due to their rendering smooth muscles insensitive to histamine.

### Discussion.

The anti-histamine and anti-anaphylactic properties of the xanthines are strikingly similar to those characterizing thymoxyethylthylamine and its allied compounds. These two groups of substances differ in their so far investigated properties in the atropine-like action, which is inherent only in the xanthine group. Contrary to the thymoxyethylthylamine group the xanthines are nontoxic. The xanthines may become useful instruments in investigations of the rôle played by histamine in physiological and pharmacological reactions.

The experiments described in this paper afford additional support to the view that anaphylactic manifestations of smooth muscles are due to the liberation of histamine.

There is evidence indicating that the xanthines are useful in the treatment of allergic conditions, especially in bronchial asthma, although the mode of action is not understood. (Literature reviewed by LAMSON and BACON 1941). Our experiments may throw some light upon the background of these therapeutic effects.

The anti-histamine, anti-anaphylactic and atropine-like actions are inherent in the simple xanthine molecule, since it alone exerts these effects as well as the methylated compounds.

### Summary.

Hitherto unknown biological properties of some xanthine derivatives are described.

1. Anti-histamine and anti-anaphylactic effects of these substances on smooth muscles are described. This action is due to their rendering the muscles insensitive to histamine.
2. On smooth muscles the xanthines also exert atropine-like effects.

### References.

- BAERTSCH, R., W. FELDBERG and E. NAGEL, *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1932, 230, 129; 1933, 231, 616.
- BOVET, D. and A. M. STAUB, *C. R. Soc. Biol., Paris* 1937, 124, 517; 1937, 125, 818.
- DALE, H. H., *J. Pharmacol.* 1913, 4, 167.
- EMMELIN, N., G. S. KAHLSON and F. WICKSELL, *Acta physiol. scand.* 1941, 2, 123.
- , G. S. KAHLSON and K. Lindström, *Ibidem* 1941, 2, 78.
- FARMER, L., *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.* 1938, 39, 204.
- KATZ, G., C. T. FREY and L. I. FREY, *Ibid.* 1939, 42, 716.
- KONZETT, H. and R. RÖSSLER, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 1940, 195, 71.
- LAMSON, R. W. and L. C. BACON, *J. Amer. Med. Ass.* 1941, 116, 915.
- ROSENTHAL, S. R. and D. MINARD, *J. exp. Med.* 1939, 70, 415.
- SCHULTZ, W. H., *J. Pharmacol.* 1910, 2, 221.
- STAUB, A. M., *Ann. Inst. Pasteur* 1939, 63, 400, 485.

## Herzgrösse und Vitalkapazität bei Schwankungen der Blutverteilung.

Von

SONIE JONSELL und TORGNY SJÖSTRAND.

(Eingereicht am 5. Juli 1941.)

Aus einer Reihe von Untersuchungen verschiedener Forscher hat sich ergeben, dass die Vitalkapazität bei Schwankungen der Blutfüllung in den unteren Extremitäten wechselt (siehe SJÖSTRAND, 1941). In welchem Umfange die diesbezüglichen Veränderungen der Blutmenge im Thorax von Blutverschiebungen nach und von den Lungen oder von einer wechselnden Blutmenge im Herzen oder den demselben benachbarten Blutgefässen bedingt werden, ist dagegen nicht entschieden worden. Untersuchungen von NYLIN (1934) scheinen zu ergeben, dass die Herzgrösse bei gesunden Personen beim Übergang von stehender zu liegender Stellung um 200 ml oder mehr variieren kann. Man kann sich auch denken, dass ähnliche Blutmengenvariationen im Herzen bei Schwankungen der Blutmenge in den unteren Extremitäten zustande kämen, wie bei Absperrung der Blutzufuhr zu den Beinen nach Einnehmen verschiedener Körperstellungen.

Im folgenden wird über einige Versuche berichtet, welche ausgeführt wurden, um diese Frage zu beleuchten.

### Methodik.

Schwankungen der Blutmenge in den unteren Extremitäten wurden auf dieselbe Weise hervorgerufen, wie es in einer früheren Arbeit angegeben ist (SJÖSTRAND, 1941), die Zunahme der Blutfüllung in den Beinen wurde aber dadurch erzielt, dass die Versuchsperson 15—20 Minuten lang stehende Haltung einnahm. Die Blutverschiebungen nach den Beinen werden hierbei geringer als bei passiver Hängelage,

was die Ursache dafür darstellt, dass die Blutmengenvariationen bei den vorliegenden Versuchen kleiner sind, als diejenigen bei denselben Versuchspersonen gelegentlich früher beschriebener Experimente.

Der Vergleich zwischen der Herzgrösse und der Vitalkapazität wurde in Horizontallage ausgeführt, aber es wurden auch einige Beobachtungen über die Herzgrösse in der gewöhnlichen aufrechten Haltung und auf der 60-gradigen schiefen Ebene bei abwärtsgerichtetem Kopf angestellt.

Die Vitalkapazität wurde mit einem Kroghschen Spirometer bestimmt; bei jeder Bestimmung wurden drei Messungen vorgenommen.

Der Herzschatten bei sagittaler Strahlenrichtung wurde in der Diastole orthodiagraphisch bestimmt. Da die Röntgenapparatur eine Orthodiagraphie in frontaler Strahlenrichtung bei Rückenlage nicht gestattete, wurde der sagittale Durchmesser des Herzens auf Tele-röntgenogrammen unter Korrektur der Vergrösserung festgestellt. Bestimmungen wurden sowohl in tiefer Inspiration wie in Expiration vorgenommen. Die Herzgrösse wurde nach der Rohrer-Kahlstorf-schen Formel berechnet.

Die Herzgrössen in Inspiration und Expiration bei blutgefüllten bzw. blutleeren Beinen wurden addiert, und der Unterschied zwischen diesen Summen wird als ein Masstab für denjenigen Teil der Variation der Vitalkapazität angegeben, welcher im äussersten Fall dem Herzen zugeschrieben werden kann.

Die Versuchspersonen waren zwei Kandidaten der Medizin, welche bereits an einer anderen ähnlichen Untersuchung teilgenommen hatten (T. SJÖSTRAND, 1941), bei der eine grössere Anzahl von Bestimmungen der Vitalkapazität im Laufe nahezu eines Jahres ausgeführt worden war. Sie waren demnach an derartige Bestimmungen gewöhnt und pflegten bei verschiedenen Versuchsgelegenheiten übereinstimmende Werte aufzuweisen.

### Versuchsergebnisse.

Die Bestimmungen der Vitalkapazität und der Herzgrösse bei wechselnder Blutmenge in den unteren Extremitäten sind in Tab. 1 zusammengestellt. Aus dieser wird ersichtlich, dass bei der Versuchsperson G-t die Herzgrösse bei Schwankungen der Vitalkapazität von in dem einen Versuch 180 ml und im anderen 320 ml unverändert war. Bei W-d schwankte die Herzgrösse bei den einzelnen Bestimmungen ein wenig, sowohl mit wie ohne gleichzeitige Veränderung der Vitalkapazität. Kleine Messfehler lassen sich röntgentechnisch nicht ausschliessen, welche diese Variationen von bis zu 100 ml ganz oder teilweise bedingen können. Wenn man auch bei dieser Versuchsperson eine Variation der Herzgrösse nicht ausschliessen kann, so vermag diese doch die Änderungen der Vitalkapazität nur zum Teil

Tab 1.

Vitalkapazität und Herzgrösse bei verschiedener Blutfüllung in den unteren Extremitäten.

Versuchs- person	Datum	Beine blutleer		Beine blutgefüllt			Differenz in ccm		
		I Vital- kapa- zität in ml	II Herzgrösse in ml		III Vital- kapa- zität in ml	IV Herzgrösse in ml		I-III	II-IV
			Insp.	Exp.		Insp.	Exp.		
G-t	4. 12.	4,500	690	700	4,680	640	680	180	70
G-t	20. 12.	4,510	730	730	4,830	750	690	320	20
W-d	6. 11.	4,080	930	920	4,490	800	900	410	150
W-d	18. 1.	4,590	840	870	4,590	820	820	90	70

zu erklären. In dem einen Versuch schwankte die Vitalkapazität um 420 ml, die Herzgrösse aber nur um 150 ml.

Aus diesen Versuchen wird also ersichtlich, dass die Veränderungen der Vitalkapazität bei Schwankungen der Blutmenge in den unteren Extremitäten überhaupt nicht oder nur zu einem kleineren Teil von einer Änderung der Herzgrösse bedingt werden.

Bei Gelegenheit der Orthodiagraphie wurden einige Fernaufnahmen des Herzens und der Lungen bei den verschiedenen Versuchszuständen gemacht. Eine Analyse derselben ergab u. a., dass das Zwerchfell bei Zuständen mit sowohl grosser wie kleiner Vitalkapazität bei maximaler Tiefatmung in dieselbe Lage verschoben wird. Das Gleiche ist bei Lagerung auf der schiefen Ebene mit abwärtsgerichtetem Kopfe der Fall. Hieraus wird also ersichtlich, dass die Änderung der Vitalkapazität kaum von Schwankungen der Blutmenge im Bauch bedingt sein kann, was auch aus Versuchen von ASMUSSEN, HOUWÜ-CHRISTENSEN und SRÖSTRAND (1939) hervorgeht.

Um zu entscheiden, ob die Veränderungen der Vitalkapazität von Variationen der Blutmenge in den grösseren Thorakalgefässen oder in den grösseren und mittelgrossen Lungengefässen herbeigeführt werden, wurde an Hand der Röntgenbilder eine Analyse der Mediastinalschattens und der Gefässzeichnung zentral in den Lungen vorgenommen. Flächenmessungen des oberen Mediastinums auf dem Frontalbild bei Versuchen an G-t ergaben bei Inspiration mit blutleeren bzw. blutgefüllten Beinen

am 4. 12. 58.8 und 56.8 gem und am 20. 12. 56.5 und 55.9 gem. Bei W-d liegen nicht genügend zahlreiche Röntgenbilder vor, um einen vollständigen Vergleich zu ermöglichen, aber die vorhandenen Aufnahmen sowie die Beobachtungen bei der Durchleuchtung sprechen für dasselbe Verhalten. Beim Vergleich von bei verschiedener Blutfüllung der unteren Extremitäten, aber sonst unter gleichen Bedingungen aufgenommenen Bildern liess sich ein Unterschied der Gefässzeichnung nicht beobachten.

Da demnach die Schwankungen der Vitalkapazität bei verschiedener Blutfüllung der unteren Extremitäten nicht oder nur zum kleineren Teil von Veränderungen der Herzgrösse oder des Füllungszustands der grösseren Thorakalgefässe oder der zentralen Lungengefässe bedingt sein können, bleibt als einzige Möglichkeit übrig, dass dieselben im wesentlichen durch Variationen der Blutmenge in der peripheren Lungengefässen zustande kommen. Man kann nicht erwarten, dass es möglich sein soll, eine solche Änderung der Blutmenge der peripheren Gefässe von der Grössenordnung, um welche es sich hier handelt, an Hand von Röntgenbildern nachzuweisen. Versuche, diese Veränderung auf Röntgenbildern von entnommenen Kaninchenlungen mit makroskopisch nachweisbaren, fleckförmig angeordneten und quantitativ beträchtlichen Blutansammlungen der von T. SJÖSTRAND (1934) und F. SJÖSTRAND und T. SJÖSTRAND (1939) beschriebenen Art sichtbar zu machen, sind auch nicht gelungen. Die Möglichkeiten eines derartigen Nachweises beim Menschen *intra vitam* müssen noch viel geringer sein.

### Zusammenfassung.

An zwei Versuchspersonen wurden im Zusammenhang mit experimentell hervorgerufenen Variationen der Blutfüllung der unteren Extremitäten Bestimmungen der Vitalkapazität und der Herzgrösse sowie eine Analyse der Gefässschatten und Gefässzeichnung vorgenommen. Hierbei ergab sich, dass die Veränderungen der Vitalkapazität nicht oder nur in geringerem Grade von Änderungen der Herzgrösse oder des Füllungszustands der grösseren Thorakalgefässe oder der grösseren bzw. mittelgrossen Lungengefässe bedingt sein können. Man muss demnach annehmen, dass diese Schwankungen der Vitalkapazität wenigstens zum grösseren Teil auf Veränderungen der Blutmenge in den peripheren Blutgefässen der Lungen beruhen.

## Literaturverzeichnis.

- ASMUSSEN, E., E. HØRWÜ-CHRISTENSEN und T. SJÖSTRAND, Skand. Arch. Physiol., 1939, 82, 193.
- BUDELMANN, G., Klin. Wschr., 1937, 16, 704, 1711, 1270.
- HAMILTON, W. F., und A. B. MORGAN, Amer. J. Physiol., 1931, 99, 526.
- NYLIN, G., Skand. Arch. Physiol., 1934, 69, 237.
- SJÖSTRAND, F. und T. SJÖSTRAND, Anat. Anz., 1938, 87, 193.
- SJÖSTRAND, T., Klin. Wschr., 1934, 13, 169.
- , Skand. Arch. Physiol., 1935, 71, Suppl.
- , Acta physiol. scand., 1941.



## The Nature of the Growth-Promoting Substances in the Embryonic Tissue Juice.

A Review of own Investigations.

By

ALBERT FISCHER.

(Received 5 July 1941.)

---

The ability to substitute loss of parts is characteristic of all living organisms. This holds true for the most primitive living beings as well as for the most complicated organisms. Whereas lower animals are able to regenerate large and complicated parts, this power is very limited in higher animals. The fundamental problem in the doctrines of regeneration is: *Why does mutilation of cells give rise to growth, which would not otherwise take place?* Among the factors involved in a simple process of regeneration as the wound-healing is the liberation of substances with growth-promoting properties. These substances, which are set free by the mutilated cells, have been designated variously by different investigators: Blastin, attraxin, auxin, wound hormones, necro-hormones, bios, archusia, trephones, desmones and others. So far we have no particular knowledge as to the nature of the growth-substances except that we know they are present in tissue extracts. It is especially the development of the technique for cultivation of animal tissue cells outside the organism, that has led to the discovery of these principles and partly revealed their nature. In 1913 CARREL (1913) found, that an addition of embryonic tissue juice to cultures of tissue cells gave rise to an increased multiplication of the cells. Later EBELING (1921) worked out a method by which the activity of substances promoting or inhibiting the growth can be measured accurately.

The first condition for isolation of certain active principles is to have a sensitive test object for estimation of the activity. This we have in the tissue cultures, even if the method still is far from being exact. In order to be able to use the method it is necessary to adopt a routine based on long experience. Two halves of one tissue culture may be cultivated under identical conditions, so that their difference in size does not amount to more than 5 per cent. The experiments must be carried out only by employment of cultures which have been carried through a number of passages, so that the original tissue fragment has been eliminated, and the cultures therefore consist of a homogeneous tissue of almost the same thickness. Concerning all the requirements for quantitative experiments, we refer to the original papers, EBELING (1921). Here, however, it will be appropriate to point out some practical experiences concerning the present investigations.

For the routine work, cover-slip cultures have been used, after the hanging drop method. The medium consists of 1 part of blood plasma and 1 part of clotting substance, in order to make the plasma coagulate. Calibrated Pasteur pipettes have been used. When one works with fresh tissue extracts, it contains the growth-substance as well as the plasma-coagulating substance. The growth-substance itself is unable to coagulate the plasma, and hence it requires an addition of a coagulating substance to the plasma (thrombokinase or thrombin). In such cases the medium of the experimental culture consists of 3 drops, namely plasma, growth-substance and clotting substance. For the controls, therefore, the medium is made up of coagulating substance and the solvent used for the growth-substance, Ringer or Tyrode solution. Immediately after the cultures have been made, an enlarged image is projected on a piece of paper and the outlines of the tissue fragments are traced. This is repeated every 24 hours during 3 days. The areas of the tracings are measured according to the usual method with a planimeter, and the experimental results are figured out and used as follows:

$$K = \frac{B-A}{A}; \quad E = \frac{B_1-A_1}{A_1}; \quad \frac{E}{K} = i \quad . . . . . (1)$$

K and E are respectively the control and the experimental culture.  
B and B<sub>1</sub> are the areas of the control and the experimental culture after 3 days of growth.

A and A<sub>1</sub> represent respectively the areas of the control and the experimental culture at the beginning of the experiment.

i is the rate of growth.

i increases with increasing activity of the particular growth-promoting substance.

Even though this may look rather simple there are still many considerations to be taken. Among others, the curve expressing the increasing concentration of growth-substance is not at all linear, but different for various types of tissue cells (CARREL and EBELING (1921), PARKER and FISCHER (1929) and PARKER (1929)). The increase in growth from 0 to 10 per cent concentration is greater than from 10 to 80 per cent. This seems to indicate that the nature of the activity is that of a catalyzer, which is supported also through other investigations (FISCHER (1930)). If wounds are made repeatedly in one of two culture-halves present in the same culture chamber in a medium without embryonic tissue juice, this particular culture will grow much faster (almost 100 per cent) than the sister culture that has not been wounded. In other words, the culture grows at the expenses of its own cells, liberating growth-substances by the mutilation. That these are not ordinary nutritive substances is evident from our experiments on the importance of the amino acids for the growth of tissue cells (FISCHER (1941)). It was shown that tissue cells cannot live — let alone grow — in a culture medium previously dialysed against Ringer solution; nor are they able to grow even when a large amount of dialysed embryo juice is added. When certain amino acids are present the cells survive without multiplying. If, besides, dialysed embryo juice is added, a pronounced growth will take place. From these findings it is obvious that the active principle in the tissue juice is a growth catalysator.

The growth of the cultures is two-dimensional, and we use the size of the areas as an expression for the growth. The increase in area, however, does not mean a corresponding increase in the weight of the tissue. By far the largest part is produced by an emigration of cells from the tissue fragment. One may say as very probable that cell division and cell emigration are co-ordinated phenomena (FISCHER and PARKER (1929)), a view that has been emphasized also by WILLMER (1933) and WILLMER and JACOBY (1933; 1936; 1937). The growth-substances may act primarily on the cell emigration; secondarily, as a consequence of the spreading of the cells, forming open meshes, cell divisions are induced. This explanation is also supported by observations on the growth of epithelial cells in cultures. Epithelial cells grow much more slowly than do cells of mesenchymal origin, as they form no open meshes but a tissue mosaic in which the individual cells are lying close together.

In spite of the disproportion between the real increase in mass and the cell emigration, the measuring of the expansion in area of the cultures may be said to give a rather good expression for the growth. Other investigators (WILLMER (1933), JACOBY (1937) and WRIGHT (1926)) have preferred to record the numbers of mitoses in the cultures, a method which is very slow and not suitable for routine work, because such counts are very inaccurate.

Several types of tissue cells react towards growth-substances in a way different from that of the heart fibroblasts. Fibroblasts from subcutaneous connective tissue, from cross-striated muscles and from periosteum respond to increasing concentration of growth-substances by passing through a definite growth optimum and then decrease in growth, (PARKER (1929)). If a substance is found to inhibit the growth, it may be because its concentration was too high. It is necessary, therefore, to carry out the experiments with serial dilutions.

Fibroblasts, isolated from embryonic chicken heart and cultivated in chicken plasma, were used for the experiments. When the growth-substance itself has no clotting effect on the blood plasma, a clotting factor has to be added. To the control as well as to the experimental culture Ringer's solution is added, containing a small amount of thrombin obtained from chicken plasma after MELLANBY (FISCHER and ASTRUP (1939)). Thrombin itself has no growth-promoting action. In other cases a tiny amount of thrombokinase (tissue juice) dissolved in Ringer's solution was added.

It has been rather difficult to obtain good expressions for the activity of a given substance. Three methods have been tried out: 1) The activity of the substance is expressed by the growth rate of the two culture-halves, with the growth of the control culture in pure plasma as zero. 2) The growth rate of the two cultures is determined, after adding to the control a solution of an arbitrary growth-substance and to the experimental culture the fraction that is to be assayed. In this case both solutions contain the same amount of substance measured as nitrogen. 3) Comparison between the activity of a standard growth-substance solution of constant concentration in the control and the unknown fraction of growth-substances in the experimental culture in an arbitrary concentration with a known N content. By a simple calculation in which the N content of the fractions (expressed in mg. per cent) is accounted for in the growth rate one obtains an expression

for the quality of the unknown substance in proportion to that of the standard solution.

$$i \frac{N_K}{N_E} = I$$

$i$  = growth rate (1).

$N_K$  = the N content of the standard solution in the control.

$N_E$  = the N content of the unknown fraction in the experimental culture; both expressed in mg. per cent of N.

This method was used a good deal. It is serviceable and gives rather good relative values when the concentrations of the substances in the control and in the experimental culture do not differ too much. The best method is the second one. It presupposes a measuring standard which will have to be arbitrary as long as the pure substance is still unknown.

When the growth of the cells will soon reach a maximum with increasing concentration of the growth-substance, we only have a rather limited concentration range to work in. So we have to work with concentrations which do not act too near the maximum growth on the one side and the residual growth on the other side of the particular cultures, which varies considerably for the individual cultures. Even when the mentioned difficulties are allowed for, the method of measuring is encumbered with pronounced errors and is far from being exact. At present, therefore, we are not able to express the activity of the growth-substance in special units, but have to be content with the comparison between the activity of a mother substance and its individual fractions.

Another pronounced difficulty met with in investigations of this kind is the aseptic procedure. Every fraction which has to be tested must be sterile. As it was shown in earlier investigations the growth-promoting substances of the tissue juice are extremely labile, and cannot resist either shaking, sterile filtration or heating, and when furthermore disinfectants cannot be used, the chances of accomplishing such a work are very small beforehand. It was necessary, therefore, to perform all the chemical operations under aseptic precautions, a task which is extremely difficult to carry through. Already 20 years ago (FISCHER (1925)), a fractionation under aseptic conditions was attempted, but did not lead to results worth mentioning except for the observation that the substances were extraordinarily labile. In addition, it was very difficult to remove completely the precipitating substances employed.

By now this has changed entirely since we have worked out methods by which the preparations may be sterilized.

Since the technique of tissue cultivation has reached a certain degree of perfection by using tissue cells from chicken, we preferred to work with tissue juice from chicken embryos. The relatively small amount of tissue juice one may produce from chicken embryos did not make the work easier. At first we thought that it would be favourable to work with tissue of the same species in order not to make the conditions more complicated by using foreign proteins. Since we learned that the active substances in the embryonic tissue juice are not specific, we chose to work with extracts of foreign tissues. This would possibly be of some advantage in judging if we are dealing with a real growth-substances or ordinary proteins which, when they are of homologous origin, might act as a general nutritive factor and thus be taken for growth-substances.

In spite of the difficulties mentioned many experiments have been made on the nature of the growth-substances from chicken embryo juice. We have produced tissue extracts from embryos which have been fractionated anatomically. Extracts were produced from brain, eyes, internal organs and the body as a whole. The extract of the body was the most active, and after this followed the extract of the eyes and brain; the least active was the extract of the internal organs. It was also tried if cells cultivated in extracts from that particular organ, from which the cells were isolated, grew better than in extracts from other parts of the embryo. An extract from the embryonic heart was found to be just as active on heart fibroblasts as on fibroblasts isolated from other organs.

We found that it made practically no difference how an extract was treated, its activity was lowered anyhow. Even staying at 0° C for longer periods of time resulted in reduced activity. Heating to 56° C gave the same results as did also filtration through a Berkefeld filter. Evaporation in vacuum rendered it almost insoluble. But the extract was found to be quite resistant to oxydation with  $H_2O_2$ .

Precipitation of the proteins in the extract did not lead to any favourable results. Precipitation with alcohol in the cold, followed by washing of the precipitate with ether gave a rather good result. Most of it could again be brought in solution in Ringer's or Tyrode's solution maintaining practically all its activity. With

trichloroacetic acid difficulties arose as to the removal of the precipitating agent. By passing  $\text{CO}_2$  through a solution of diluted extract a fraction was obtained, but it was considerably less active than the fresh extract. Precipitation with acetic acid at pH values between 7.3 and 4.8 and resolution of the precipitate in mol/15 secondary phosphate yielded fractions which all were somewhat active, but not nearly as active as the original solution. Fractionated precipitation with acetone was also tried. The most active portion was the one obtained with  $\frac{1}{2}$  vol. acetone. None of the fractions showed the activity of the original solution.

Fractionated precipitation with ammonium sulphate at 0.4, 0.6 and 0.8 saturation gave no definite results. The fraction at 0.4 saturation was the most active, however. The precipitates were dissolved in distilled water and dialyzed under pressure in the cold against Ringer's solution.

Various absorption methods were tried which did not lead to any purification. Absorption was carried out with charcoal, aluminium hydroxide, franconit, calcium carbonate, tricalcium phosphate and others. Experiments were made also with chromatographic analysis in order to see whether this would give some orientating information, but it had to be given up on account of poor separation and retention of the substances in the uppermost layers and, not least, because of denaturation of the proteins.

All these investigations were carried out with fresh embryonic tissue under strictly aseptic precautions.

The experiments seem to indicate that the active components belong to extremely labile proteins which are readily denatured. This is supported furthermore by the fact that digestion with trypsin for a short time at pH 7.5—8.0 gives inactivation. Absorption experiments as well as ultrafiltration of the extract (BAKER and CARREL (1926)) turned out in the same way. The micromolecular components of the extract show no activity (FISCHER, (1925) and BAKER and CARREL (1928)). Contrary to the statement of WRIGHT (1926) we found that dialysis of the tissue juice for long periods of time against Ringer's solution did not cause any loss of activity, provided that denatured proteins are not precipitated in the membrane.

Furthermore we tried the possibility of an isolation by means of centrifugation. To genuine embryonic tissue juice 1 vol. of mol/15 secondary phosphate was added, and the solution was centrifuged 10—11 hours at 16,000 r. p. m. The small heavy precipitate, dissolved in a little Tyrode's solution, was found to be active, but it did not exceed the activity of the supernatant

fluid. The extracts contain thus some rather large components which may be separated easily under the conditions mentioned. Even after very high dilution of the extract with Ringer's solution we have been able to demonstrate the presence of large components. We have been able to demonstrate that if an extract is diluted 1 : 500 or 1 : 1,000 in Ringer's solution and centrifuged for 1 hour at 16,000 r. p. m., more than half of the extract will be precipitated. We measured the amount by determining its coagulating effect (thrombokinase) on chicken plasma. This does not necessarily mean, that the substance with the thrombokinase activity should be identical with the growth-substance or combined with it. The experiment only shows that the embryonic tissue juice as such contains very large component-systems.

Also CLAUDE (1938, 1939, 1940) has been able by differential centrifugation at high speed to isolate from normal chicken embryos a high-molecular component with similar properties as those of the purified Rous chicken sarcoma virus. Employing the same technique as CLAUDE, TENNANT and coworkers (1941) isolated a macromolecular material of embryonic tissue juice from normal chicken embryos by means of the high-speed centrifuging. The preparation was tested on cultures of tissues from embryonic mouse heart. The authors found a growth-promoting activity which seemed to increase after heating in water-bath at 100° C. Their experiments, we think, suggest that the growth-promoting activity, which is small, depends rather on an ordinary nutrient than on any specific growth-promoting substance. After heat inactivation of embryonic tissue juice LASNITZKI (1937) found a remanent activity which gave rise to a larger growth than the control cultures in Tyrode's solution. Previously we had made similar observations after heat inactivation of the growth-promoting substances. This rest activity may have nothing to do with the growth-substance. Concerning the chemical nature of the growth-promoting substances — whether they are isolated from yeast, normal animal tissue cells or from tumor cells (LOORBOUROW and coworkers (1938, 1939)), — they seem to be nucleic acid derivatives of the ribose type. Here, in passing, it may be mentioned that the growth-substances of plants (auxin, biotin or combinations of biotin and aneurin), given to us by Professor KÖGL, showed no activity on animal tissue cells.

The embryonic extract contains large amounts of fats and lipoids which do not appear to take any part in the growth-promoting activity. BAKER and CARREL (1925) extracted the juice precipitated by alcohol with acetone and ether. This extract, free from lipoids, was found to be just as active as the original juice. The extracted lipoids and fats had a growth-inhibiting action on the cells. This was also confirmed by E. MAYER (1936).

BAKER and CARREL (1928) discovered that growth-stimulating substances were formed after partial hydrolysis of certain proteins, i. e.,



fibrin, brain and liver. When after digestion with pepsin for  $3\frac{1}{2}$  hour the ratio total N/amino N was 4.3/6.5, the most active substances were produced. After longer digestion the product became toxic. These products are probably not identical with the real growth-substances, as they are not able to maintain the growth of tissue cells over longer periods of time.

When, after an intermission of several years, we again began the investigations on the nature of the growth-promoting substances, we therefore decided to try new ways. Experiments on desiccation of the embryonic extract were commenced, using high vacuum and  $H_2SO_4$ . Such experiments have been performed previously by BORGER and ZENKER (1931). These extracts, which we had the opportunity to try, showed — as was to be expected — only little activity, probably on account of their slight solubility. We decided nevertheless to take up the experiments again and use the dry extracts for further purification, even if a great loss of active substances was connected with the drying process. Fresh chicken embryonic juice was evaporated at room temperature by placing dishes containing the extract under an electrical fan. That part of the powder which could be dissolved in Ringer's solution was distinctly active, though less than the genuine extract. The powder was extracted with chloroform and benzene in order to remove the fats and lipoids. The activity was hereby increased. — These experiments gave two important results: 1) The dried extract can stand benzene and chloroform an almost unlimited length of time, whereby it is sterilized; 2) The growth-promoting activity of the extract increases after the extraction of the fats. The finely powdered dry extract may be sterilized in this way, which means a great progress in the technique. Later it was found that the activity of dried extracts can keep for years.

In order to obtain large amounts of material for the purification experiments, we decided to work with extracts of embryos from large mammals. While earlier we worked with a few grams of extracts, we were now able to operate with many kilograms by using extracts of bovine embryos. Such have been used before in the tissue culture technique, (GEY, G. O. and GEY, M. K. (1936)). The durability of dried bovine embryo extract — at this writing, kept for 4 years — has proved to be exceedingly good. The bovine extract was found to be active on the growth of chicken cells, just as well as the chicken embryo juice is active on tissue cells from mice, rats, rabbits, guinea-pigs and man. Bovine embryo

extract is very active on human tissue cells in vitro as well as in vivo. After application of the extract on human wounds it was observed that the healing could be accelerated up to 50 per cent of the normal rate, (E. NIELSEN (1939), W. GRANT WAUGH (1940)).

The solubility of the dried extract depends on the method of its desiccation. After removal of the fats its solubility in physiol. NaCl solution is increased. The amount of fats which can be extracted is about 5—10 per cent. The ratio protein N/rest N of a watery solution is about 0.8. The solution remains clear after boiling. With ammonium sulphate only a negligible amount is precipitated at 0.3—0.4 saturation. The precipitation increases rapidly up to a concentration of 0.6 and then slowly up to 0.8. A similar ammonium sulphate spectrum has been found for fresh chick embryo extract.

Contrary to the genuine embryo extract, a solution of dried extract may be filtered through Berkefeld or asbestos filters with no loss of activity. Previous experiments mentioned above, according to which the chicken embryo extract could not be filtered, were interpreted as due to a special property of the active substances. Now we know that this is not correct. The genuine tissue juice contains large amounts of mucin and other viscous substances, and this is probably the main cause of the retention of the active substances in the filter. By dissolving the dried extract the mucinous material is largely left behind together with the rest of the denatured proteins.

We made numerous fractionations with dried bovine embryo extract, similar to those carried out with chick embryo extract. On account of the very large amounts of material, which are now at our disposal, we isolated globulin and albumin fractions by salting out with ammonium sulphate. Fractionated precipitations with acid were also done. None of these operations led to results worth mentioning. On the basis of our present knowledge of the chemical nature of different viruses we decided to investigate the nucleo-proteins of the tissue juice. The method of HAMMARSTEN (1924) was employed. Briefly, the principle consists in treating the dried extract with diluted HCl for 24 hours. To the precipitate is added diluted NaOH. After a certain length of time the filtrate herefrom is acidified with HCl, the precipitate obtained is dried and contains nucleoproteins which can be purified after reprecipitations. These were found to be much more active than the

intact material, though a good deal is lost by this method of purification.

This group of substances are not very soluble in pure water. By careful neutralization they can be brought into complete solution, though as a rule a small rest remains insoluble. The active fraction passes readily through a Berkefeld filter, preserving its full activity. On boiling the solution remains clear but loses its activity; and it is practically rendered inactive by heating to 56° C for 15 min. These investigations also suggest that the active substance involves an instable protein. The activity disappears entirely after a short digestion with trypsin, also after a digestion with pepsin. The substance may be characterized as rather resistant to acids but not to alkali. A solution at pH 8—9 loses its activity in a rather short time, and the inactivation rate is highly dependent of the temperature. The possibility for separating the active components by the high-speed centrifuging was tried several times. We used the air driven ultracentrifuge (BEAMS). After a 3—4 hours centrifuging at a speed of 30—40,000 r. p. m. a small transparent pellet was formed in the tube. Dissolved in Tyrode's solution it showed some activity but in no way exceeding that of the supernatant fluid. Further purification of the nucleoprotein could not be obtained by repeated precipitations. After one reprecipitation the activity was reduced noticeably and the nucleoprotein becomes increasingly inactive with each reprecipitation. After each reprecipitation there was an insoluble rest of denatured proteins.

We tried to isolate the protein component of the nucleoprotein in different ways. The best way was to salt out the protein when the neutral solution of the nucleoprotein had been dialyzed against physiol. NaCl. The isolated protein contained only a small amount of P and was still fairly active.

Characteristic of these nucleoproteins is that the N and P content is too low. The ratio P/N is about 12 per cent instead of 33 per cent — according to HAMMARSTEN. The explanation of this may be that the preparations contain carbohydrates.

If the protein part of the growth-substance be a specific one, responsible for its function, it is not likely to be combined with nucleic acid as a simple salt, but makes a part of the intact molecule. Otherwise accidental proteins might combine with the nucleic acids. So it seems reasonable to think that the nucleic acid is combined with the protein, and that this compound re-

presents the active molecule. On the other hand we made the following observations concerning experiments on linkage. A solution of a nucleoprotein at neutral reaction was boiled for 5 min. and afterwards precipitated with HCl. After this, its activity was practically 0 (the preparation called 9.13 F). Another part of the solution, not boiled, was precipitated in the same way. After this reprecipitation it had, as usual, lost a part of its activity (the preparation called 9, 11 C). By mixing these 2 solutions and measuring the activity against controls, which each contained the single components of the mixture and in the same concentration as they are present in the mixture, we observed a very pronounced increase in activity, up to 100 per cent. Supposing that the growth-substance is really composed of such components, it is conceivable that a dissociation might have taken place during the preparation whereby one of them by chance may be in excess. The explanation would probably be this; after reprecipitation a part of the thermostabile component would be lost, which then would be replaced by addition of the boiled portion, which contains the thermostabile component intact. Attempts to isolate a possible prostetic group were not successful. The method used was acid precipitation of a nucleoprotein in a concentrated solution of NaCl. Fractionated precipitation with clupein was tried also. More experiments of this kind in connection with separation by means of electrophoresis will be reported later.

Precipitation of the nucleoproteins as calcium salts according to HAMMARSTEN was tried. This procedure appeared to increase the activity of the mother solution.

Some special facts in the precipitations of the nucleoproteins are to be mentioned briefly. When a nucleoprotein fraction is dissolved in the usual way and precipitated with HCl, the precipitation is not complete. A rather large part of the substance remains in the solution, and it can be obtained only after addition of acetone. We designate the fractions precipitated with acid as C and those precipitated with acetone as E. The activity is to be found, chiefly in the C fraction, which generally is less soluble than the E fraction, whereas the activity of the latter is slight. After 1—2 reprecipitations of the C fraction the solution does no longer contain any fraction E. At the same time, denaturation takes place in the C fraction, as is evident from the appearance of insoluble rests, and its activity is reduced. The reaction of both fractions in solution is acid. The spectrograms of these fractions

in ultraviolet show, after continued reprecipitations, that the absorption curves approach a definite maximum, near 2,600 Å, corresponding to the nucleic acid. Parallel herewith the activity of the substance decreases. This, together with the observation that the substances which are precipitated with Ca are without any activity, might indicate that the growth-substances may be found outside of the nucleoprotein. Neither the pure thymonucleic acid nor the yeast nucleic acid possess growth-proliferating properties. No coupling effect is obtained by mixing a C fraction together with an E fraction.

If a nucleoprotein fraction is precipitated with acetic acid — acetate mixture (pH 4.7), a reaction which is near that of the isoelectrical point of certain proteins, a C fraction is obtained which is practically inactive. Even if the precipitate is brought into solution without being dried beforehand, only a small part may be dissolved at a weak basic reaction. It is known that acetate keeps nucleic acids in solution. With acetate mixtures, therefore, it is chiefly denatured proteins that are precipitated. When the mother solution from the acetate precipitation is treated with acetone, the corresponding E fraction is obtained, which likewise is inactive. Both components in a mixture are also inactive. But after precipitation with acetic acid a C fraction is obtained which is active — just as those with HCl.

These facts seem to indicate that a special protein, inactive, but in combination with certain nucleic acids possibly forms the active component, the nucleoprotein. On precipitation with acid alone most likely the intact growth-substance is obtained, as the nucleic acid largely protects the protein from denaturation.

In other words we possibly have to do with rather definite fractions, the properties of which depend on the method of precipitation, and which can be characterized in the following way. The first precipitation of the nucleoproteins with CO<sub>2</sub>, acetic acid or hydrochloric acid gives always active products, whereas the acetone-precipitated rest is much less active. The former are only partly soluble in water, the latter easily soluble. Both fractions, C and E, are acid products. The C fraction obtained with acetic acid-acetate mixture is almost insoluble in alkali and inactive.

The analysis of the fractions mentioned, which will be published later, appeared to agree with the observations made by JORPES (1928), LEVENE and JORPES (1930) and more recently by CASPERSON (1939), namely; that the pentose nucleotides mainly are

to be found in the protoplasm of cells which are proliferating actively, and the thymonucleic acid in the resting cells. The two fractions, C and E, which are produced respectively by precipitation with acetic acid and, after this, with acetone, are similar to the two fractions which JORPES and LEVENE described in their attempts to separate the thymonucleic acid from the ribose nucleotides in the pancreas nucleic acid.

On the other hand, it was found that the less active E fractions sometimes contained much larger amounts of pentose than the corresponding active C fractions. A part of the pentoses is possibly derived from glucuronic acids, which are present in larger amounts in the E fraction. There is at present some doubt as to whether the pentose nucleic acid after all belongs to the active principle or not. If we compare the amount of pentose with that of P, then the amount of yeast nucleic acid together with that of thymonucleic acid in the active substance is too small to account for all the phosphorus. It is possible, however, that a part of the phosphorus may belong to special phosphorus proteins.

So far the quantitative analyses have given us only few directive facts for further purification of the active compound, because the active as well as the inactive fractions have almost the same quantitative composition. The question is therefore whether the isolated components have been intact or not, *i. e.*, whether they have been able to withstand the different chemical operations.

Whether there exist a connection between the activity of the extract and the presence of certain enzymes is still unsettled. Here we have in mind especially certain proteinases and polypeptidases. BORGER and PETERS (1933) found a dipeptidase and a polypeptidase in the fresh extract, the amount of which was found to be proportional to its growth-promoting activity. Likewise HUEPER and coworkers (1933) found a cathepsin in the extract. The durability of these enzymes in the extract does not seem to be very great. Nor have we been able to demonstrate a nucleidase activity.

Professor K. LINDERSTRÖM-LANG was kind enough to test a three year-old active nucleoprotein for dipeptidase and polypeptidase activity but did not find any. Nor did it show any evidence of activity due to cathepsin. The substance was tested on alanyl-glycine as well as on alanyl-glycyl glycine.

We have paid attention also to the question whether the extract might contain activator substances for certain enzymatic systems

present in the blood-plasma or anchored to the surface of the cells. Most likely, cystin and cystein are such activators, (FISCHER (1941)). According to EPHRUSSI (1932) and RAPKINE (1937) the fresh embryonic tissue juice is rich in -SH. These authors think the activity of the extract is due to thiol-compounds. SACHS (1934) is of the opinion that the reducing property of the extract is one of the main factors in its activity, but HUEPER and co-workers (1933) cannot subscribe to this view. SACHS (1934) tried to demonstrate different dehydrogenases in the extract and found the following systems: xanthine-xanthineoxidase; hypoxanthine-xanthineoxidase; succinic acid-succinic dehydrogenase; lactic acid-lactic acid dehydrase; glucose-glucose dehydrase; citric acid-citric acid dehydrase.

We were able with cystin to demonstrate a small but pronounced reducing activity in the purified nucleoprotein from calf embryo extract, due to its content of fixed -SH groups. After oxidation of the extract with cystin under aeration the reducing properties disappear, (HOPKINS (1925)). Whether the activity of the extract is associated with the content of -SH and to which extent we are not yet able to tell. Investigations hereon are being continued.

### Summary.

1. Twenty years of investigations (hitherto not published) on the chemical and physical nature of the growth-promoting substance in the embryonic tissue juice are summarized by the author.

2. The use of various methods for determination of the activity of the substances is discussed.

3. Fractionation experiments on genuine chick-embryo juice are described.

4. On account of the extreme lability of the active substances, special methods were devised for obtaining sterile, active fractions. In spite of all precautions a purification was not obtained.

5. It meant a great progress of the work, when it was found that the carefully desiccated tissue juice was resistant to extraction with chloroform, benzene a. o., whereby inactive fats and lipoids were removed and the extract rendered sterile.

6. Purification experiments were undertaken with large quantities of dried, fat-free beef-embryo extract. The nucleoproteins,

isolated according to the method of HAMMARSTEN, were found to be more active than the whole extract.

7. Contrary to the genuine extract the solution of the nucleoproteins passes readily through a Berkefeld filter maintaining its full activity. The solution is rendered inactive by heating to 56° C for 15 min., likewise after a short digestion with trypsin or pepsin. It is more resistant towards acids than towards alkali. The activity of the solutions is maintained after dialysis. The activity seem to be linked to a protein. A purification could not be obtained by the high-speed centrifuging.

8. The ratio P/N of the nucleoproteins is rather low, about 12 per cent. The active substances contain thymonucleic acid as well as ribosenucleotides. Neither the nucleic acids nor the protein compound alone were active. Finally reprecipitations of the nucleoproteins led to inactive products, whereby proteins are denatured. The characteristics of various fractions are described.

9. The chemical analysis of the products, whether active or inactive, have so far given no directive facts for further purifications. The activity of the substances depend probably on the intactness of an extremely labile component system, a special phosphoprotein or a nucleoprotein.

10. The active substance did not show any dipeptidase or polypeptidase activity. Nor was there any evidence of activity due to a cathepsin.

#### References.

- BAKER, L. and A. CARREL: J. Exp. Med. 1925, 42, 143.  
—, Ibidem 1926, 44, 397.  
—, Ibidem 1928, 47, 353.  
BORGER, G. and T. PETERS: Z. physiol. Chem. 1933, 214, 91.  
BORGER, G. and R. ZENKER: Verh. dtsh. Path. Ges. 1931, 123.  
—, Arch. exp. Zellforsch. 1932, 12, 347.  
CARREL, A.: J. Exp. Med. 1913, 17, 14.  
CARREL, A. and A. H. EBELING: Ibidem 1921, 34, 317.  
CASPERSSON, T. and J. SCHULTZ: Nature, 1939, 143, 602.  
CLAUDE, A.: Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y. 1938, 39, 398.  
—, Science, 1938, 87, 467; 1939, 90, 213; 1940, 91, 77.  
EBELING, A. H.: J. Exp. Med. 1921, 34, 231.  
EPHRUSSI, B.: La culture des tissus, Paris 1932.  
FISCHER, A.: Tissue Culture, London 1925.  
—, Virchow's Arch. 1930, 279, 94.  
—, Acta Physiol. Scand. 1941, 2, 143.  
FISCHER, A. and T. ASTRUP: Arch. exp. Zellforsch. 1939, 23, 76.



- FISCHER, A. and R. C. PARKER: Brit. J. Exp. Path. 1929, 10, 312.  
GEY, G. O. and M. K. GEY: Amer. J. Cancer, 1936, 27, 45.  
GRANT WAUGH, W.: Brit. Med. J. 1940, p. 249.  
HAMMARSTEN, E.: Hoppe-Seyl. Z. 1920, 109, 141.  
HOPKINS, F. G.: Biochem. J. 1925, 19, 787.  
HUEPER, W. C., A. ALLEN, M. RUSSEL, G. WOODWARD and M. PLATT:  
Amer. J. Cancer, 1933, 17, 74.  
JACOBY, F., O. A. TROWELL and E. N. WILLMER: J. exp. Biol. 1937,  
11, 255.  
JORPES, E.: Acta Med. Scand. 1928, 68, 503.  
LEVENE, P. A. and E. JORPES: J. Biol. Chem. 1930, 86, 389.  
LOOFBOUROW, J. R., E. S. COOK and SISTER M. M. STEINSON: Nature,  
1938, 142, 573; 1939, 144, 553 and 939.  
MAYER, E.: Skand. Arch. Physiol. 1936, 75, 1.  
NIELSEN, E.: Ugeskrift for Læger, 1939, 37, 1071.  
PARKER, R. C.: Arch. exp. Zellforsch. 1929, 8, 340.  
PARKER, R. C. and A. FISCHER: Proc. Soc. exp. Biol., N. Y. 1929, 26,  
580.  
RAPKINE, L.: J. chimie physique, 1937, 34, 416.  
SACHS, D.: Arch. exp. Zellforsch. 1934, 15, 179.  
TENNANT, R., A. AVERILL and G. KURT STERN: Proc. Soc. Exp. Biol.,  
N. Y. 1941, 46, 18.  
WILLMER, E. N.: J. Exp. Biol. 1933, 10, 317, 323, 340.  
—, Ibidem 1936, 13, 237.  
WRIGHT, G. P.: J. exp. med. 1926, 43, 591.

From the Pharmacological Dep. of Karolinska Institutet, Stockholm.

## Criteria of Alcohol Intoxication in Animals in Relation to Blood Alcohol.

By

LEONARD GOLDBERG and TORE P. STÖRTEBECKER (Oslo).

(Received 14 July 1941.)

---

Studies have been made of the effect of ethyl alcohol on animals partly by following the symptomatology, partly by fixing the alcohol percentage in the system. As far as the former is concerned, disturbance of equilibrium and gait have been taken as criteria: FLOURENS (1824), JOUFFROY and SERVEAUX (1897), BAER (1898), NICLOUX (1900), MELLANBY (1919), KURÉ, SHINOSAKI, SATO and NAGANO (1923), ROST and BRAUN (1926), TURNER (1932), GETTLER and FREIREICH (1935), STÖRTEBECKER (1937 a, b), NEWMAN and CARD (1937 a, b) and NEWMAN and LEHMAN (1938). Among the numerous other symptoms observed righting reflexes in particular have awakened interest: VERSTEEGH (1922), SCHOEN (1926), ALEXANDROFF and TALPIS (1928), SHINOMYIA, NAGAMI and TSUGAMOTO (1932), GOLD and TRAVELL (1933), STEINMETZER (1935), and in modified form: KAJIWARA (1931) and STÖRTEBECKER (1939), further postural nystagmus: ROTHFELD (1913), VERSTEEGH (1922), DE KLEYN and VERSTEEGH (1930) and DE KLEYN (1934), disturbance of sensitivity: LÉVY (1935) and KLOTZ (1937) and lastly the death of the animal: ABDERHALDEN and WERTHEIMER (1927), HAGGARD and GREENBERG (1937), AGDUHR (1938) a. o.

Some investigators have made use of the alcohol percentage in the system as a criterion of the effect: the blood alcohol by HAGGARD and GREENBERG (1937), the alcohol of the cerebrospinal fluid by GETTLER and FREIREICH (1931) and the brain alcohol by GETTLER and FREIREICH (1935), LÉVY (1935), NEWMAN and LEHMAN (1938) and MOLLESTAD (pers. comm.).

Lastly the relation between symptoms and the alcohol percentage has been the object of study. Those investigating this problem have, however, on the one hand differentiated the symptomatology too little in relation to the determination of the alcohol percentage (NICLOUX 1900, MELLANBY 1919, TURNER 1932, GETTLER and FREIREICH 1935) and, on the other hand, in cases when a number of symptoms have been observed, they pointed out the considerable variations in individual tolerance (NEWMAN and CARD 1937 a, b, NEWMAN and LEHMAN 1938) without more closely going into the extent of it.

This work is intended to follow symptomatology on rabbit after the injection of alcohol, to show its relation to the prevailing blood alcohol percentage and the magnitude of the variations, and further to decide whether symptomatology, blood alcohol percentage or the relation between these quantities are so constant in their appearance that they may serve as criteria of the alcohol effect.

## Experimental.

### Methods.

Grey female rabbits weighing 2,200—3,400 g were used for the experiments. The ethyl alcohol, 2.0—3.25 g alc. abs. pr kg body weight, diluted with Ringer solution to 33 per cent by volume, was given intravenously, 1 ml per min, in the marginal vein of the ear. By this means the effect of possible variations in the absorption from the gastro-intestinal tract was eliminated and the maximum alcohol effect was reached at the time the injection was completed.

As criteria of the alcohol effect it was decided to observe: the corneal reflex, righting reflexes, spontaneous activity, the normal sitting posture (chin sign), the coordination when moving (ataxia) and postural nystagmus.

The corneal reflex in all the experiments with the doses used proved to be positive and has not been included in the tables.

The righting reflexes were divided into the head reflex, the forelimb reflexes and the hindlimb reflexes in accordance with STÖRTEBECKER (1939), though the definitions have been given with greater precision.

The *head reflex* was graded as follows:

⊕ = Head in normal position.

⊕ = Head in side position, normal position after sensitive excitation.

— = Head in side position, also after sensitive excitation.

*Forelimb reflexes:*

⊕ = Fore part of body in normal position, fore paws "drawn in".

- $\pm$  = Fore part of body in side position, normal position after sensitive excitation.
- = Fore part of body in side position, also after sensitive excitation, fore paws "spread out".

*Hindlimb reflexes:*

- $+$  = Hind part of body in normal position, hind paws "drawn in".
- $\pm$  = Hind part of body in side position, normal position after sensitive excitation.
- = Hind part of body in side position, also after sensitive excitation, hind paws "spread out".

*Spontaneous activity:*

- $+$  = Attempts of crawling or jumping after sensitive excitation.
- $++$  = Repeated jumps.
- $+++$  = Animated jumps to slight excitation.

*Chin sign:*

- $+$  = Normal sitting posture with all righting reflexes positive, head raised from the ground and chin more than 3 cm above this.
- = Head resting or chin less than 3 cm above ground.

*Ataxia:*

- $+$  = Latent ataxia: no obvious disturbances of coordination in spontaneous movements but bad balance when touching objects or when pushed.
- $++$  = Obvious ataxia: the animal falls after a few jumps and shows failing coordination between forelimbs and hindlimbs when moving.
- $+++$  = Pronounced ataxia: falls at every attempt to move.

*Postural nystagmus:* only nystagmus, characteristic of alcohol (ROTH-FELD 1913):

- $+$  = Obvious nystagmus: appears when head in side position after a latency of 30", frequency 20—40 strokes per min.
- $++$  = Intense nystagmus: latency 5"—10", frequency 40—120 strokes per min.
- $+++$  = Maximal nystagmus: latency 2"—5", frequency over 120 strokes per min.

The intensity of the symptoms and their relation to the prevailing blood alcohol percentages were observed.

Blood samples were taken by heart puncture, 1 ml each time. In order to avoid coagulation the syringe was wetted with 1 % heparine solution, after which the samples were transferred into WIDMARK capillary tubes (1932). — The heparine solution should not contain cresol and can be kept without it for several months and be sterilized (JORGES, pers. comm.). Cresol may have a reducing effect when used in alcohol determination according to WIDMARK (1932), and may thus simulate alcohol, though its concentration in these experiments, where it has been used, was too low to play any rôle.

The samples were taken during the first hour after the injection was completed every 10—20 min, subsequently at intervals of 30—60 min, 2—4 capillary tubes at every time.

Alcohol analysis according to WIDMARK's micro-method (1932).

$\beta$  and  $c_0$  were calculated according to the method of Least Squares (WIDMARK 1932), likewise the standard error of  $\beta$  and  $c_0$  (BERNHARD and GOLDBERG 1935). In order to avoid the diffusion phase, which owing to its diverging form (p. 75) changes the size of  $\beta$ , the blood alcohol percentage after 120 min or later has been taken as a first value; as a basis for the calculation 5 points have as a rule served with 60 min's intervals and 2—3 determinations of every point.

## Results.

### Symptomatology and Blood Alcohol Curve.

*Symptomatology.* When alcohol is injected intravenously, the absorption phase is eliminated and consequently the alcohol effect is at its height as soon as the injection is completed. After a dose of 2.4 g alc. abs. per kg body weight the animals lay with all righting reflexes negative and without any spontaneous activity. Respiration was rapid and superficial, the corneal reflex positive; in addition an intense postural nystagmus, typical of alcohol (ROTHFELD 1913, DE KLEYN and VERSTEEGH 1930), was observed: in a side position the rapid phase was forward on the upward looking eye and reversed on the eye looking downward; the frequency was high at first: 100—200 strokes per min, and the latency for its release only a few seconds on turning the head.

The order in which the different symptoms generally appeared during recovery from the intoxication was as follows: the head reflex was the first visible of the righting reflexes, then came the forelimb and the hindlimb reflexes, simultaneous with spontaneous activity; the normal sitting posture was next observed, when nystagmus too disappeared; ataxia usually lasting longest.

When injecting alcohol in a dose of 3.25 g per kg or less but more rapidly than 1 ml 33 % solution per min, there also appeared in addition to a more intense postural nystagmus tonic and clonic convulsions in the limbs, which developed into jumping movements, an opisthotonic position and finally a rotation of the whole animal lengthwise; the postural nystagmus ceased for a minute and then began striking in the opposite direction. This phenomenon was repeated several times in the next 5—10 minutes after the completion of the injection. A similar syndrome, though without any postural nystagmus, was observed by KLEITMAN and MAGNUS after asphyxia (1924 a) and after insulin shock

(1924 b) as well as by DUSSEY DE BARENNE (1936) after the partial extirpation of the cerebellum.

*Blood alcohol curve.* The first part of the curve (the diffusion phase) was marked by a more rapid decline as compared with the rest, resembling in the main an exponential curve (fig. 1). The change into the rectilinear part of the curve (see below) took place after 70 min on an average, the shortest time being 30 min and the longest 120 min.

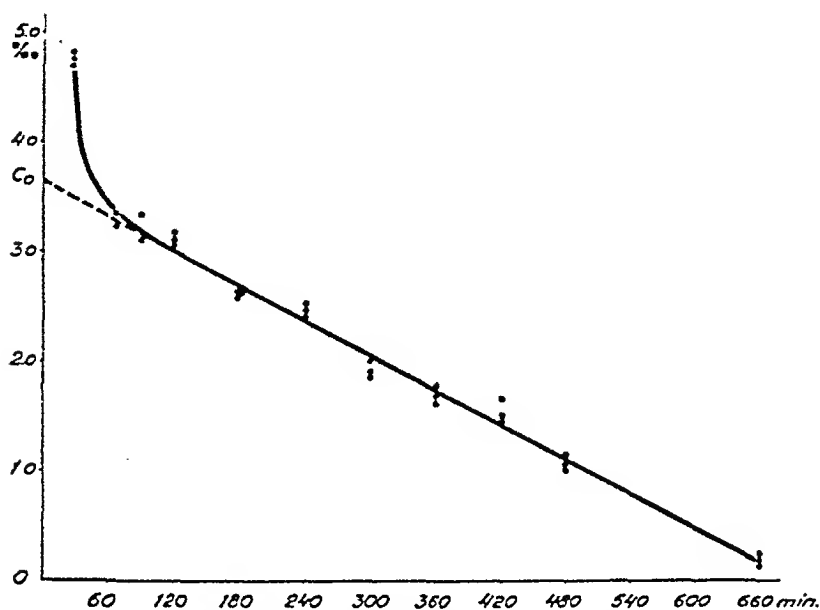


Fig. 1.

25. 11. 40. Exp. 54. Rabbit 22. Weight 2335 g. 3.25 g alc. abs. pr kg body weight.

$\beta = 0.0053 \text{ ‰} \pm 0.0001$ ;  $c_0 = 3.63 \text{ ‰} \pm 0.04$ ;  $r = 0.89$ .

The latter part of the curve (the post-absorptive phase) in rabbit was considered rectilinear by OLOW (1924), KEESER and OELKERS (1937), NEWMAN and LEHMAN (1937) and BÁRÁNY (pers. comm.), while MEYER (1935) and ASCHOFF (1938) maintain that irregular curves are the rule. In our experiments this phase has been rectilinear (fig. 1), and  $\beta$  (WIDMARK 1932) varied between  $0.0039 \text{ ‰}$  and  $0.0058 \text{ ‰}$  with an average of  $0.0048 \text{ ‰} \pm 0.0002$  (15 animals); the standard deviation was  $\pm 0.0006 \text{ ‰}$ , corresponding to  $\pm 11.7 \%$  of the average (table 2).

OLOW's considerable variation of  $\beta$  (1924) and the fact that in a third of his cases he found an exponential curve, must be attributed to the manner in which he calculated  $\beta$ : the diffusion phase.

was included in the majority of cases; MEYER's (1935) and ASCHOFF's (1938) variations are due to the all too few values in the post-absorptive period.

The distribution factor  $r$  (WIDMARK 1932) varied in our experiments between 0.75 and 0.96 with an average of  $0.87 \pm 0.02$  (15 animals); the standard deviation was  $\pm 0.07$ , corresponding to  $\pm 7.7\%$  of the average (table 2).

Values of  $r$  over 1.0 in rabbits were observed not only in alcohol ingestion, where such a value might be explained either by part of the alcohol being bound in the intestinal tract with incomplete absorption (WIDMARK 1934, NEYMARK and WIDMARK 1936) or by a high initial combustion (LE BRETON 1936, EGGLETON 1940 a, b), but also in cases of intravenous administration (NEWMAN and LEHMAN 1937). These last-mentioned authors found  $r$  to have a higher value with a small dose — 1.29 for 1.5 g alc. per kg — as contrasted with 0.93 for 3 g per kg,  $\beta$  being constant. This would indicate an initial high rate of destruction even when alcohol is administered intravenously, as suggested by LE BRETON (1936) and EGGLETON (1940 a, b). From our material we have not been able to prove any relation between  $r$  and the dose injected (table 2) and the reason for the high  $r$ -values in rabbit as opposed to man (WIDMARK 1932), dog (WIDMARK 1933) and cat (EGGLETON 1940 a, b) must still be left open.

#### **Relation between Symptoms and Blood Alcohol Percentage.**

The blood alcohol percentage was followed simultaneously with the registration of the changes in the symptomatology. The blood alcohol was related to the following data: the righting reflexes, when they were entirely positive, and for the spontaneous activity the first attempt of crawling, for the normal sitting posture when the chin sign became positive, for the ataxia the moment when it still remained »latent» and finally the same criterion for the postural nystagmus. An example of the relation between symptoms and blood alcohol percentage is given below in table 1.

A general survey of the whole material is given in table 2.

From this it is evident that after intravenous administration of alcohol the righting reflexes returned with the highest blood percentage. Spontaneous activity, as has already been pointed out, usually began when the hindlimb reflexes became positive, and chin sign appeared somewhat later. Ataxia was among the

Table 1.

*Relation between Intensity of Symptoms and Blood Alcohol Percentage.*

Exp. 24. 6. 2. —38. Rabbit 17. 2430 g. 2.4 g alc.abs. pr kg at 13°.

Time min.	Blood alc.		Intensity of Symptoms						
	Pro- mille	Aver.	Righting reflexes			Spont. activity	Chin sign cm	Ataxia	Ny- stag- mus
			Head	Fore- limbs	Hind- limbs				
31 . . .	3.04 3.11	3.08	+ -	-	-	-	0		++
33 . . .			+ -	-	-	-	0		++
36 . . .			+ -	+ -	-	-	0		++
41 . . .			+	÷	-	-	0		+
44 . . .			+	÷	-	-	0		+
58 . . .					-	-	0		+
68 . . .	2.50 2.55	2.53			-	+	0	+++	+
76 . . .					+ -	+	0-2	++	+
88 . . .					+	+	0-2	++	+
91 . . .	2.31 2.49 2.60	2.47			+	+	0-2	++	-
111 . . .						+	1-3	+	-
120 . . .	2.22 2.38	2.80				++	2-4	+	
131 . . .						++	2-4	+	
168 . . .	2.24 2.04 2.09 2.14	2.13				+++	3-5	-	
192 . . .	2.08 1.92	2.00				+++	3-6	-	
247 . . .	1.74 1.74 1.80 1.68	1.74					3-6		

$$\beta = 0.0043 \text{ } \text{‰} \pm 0.00041$$

$$c_0 = 2.83 \text{ } \text{‰} \pm 0.07$$

$$r = 0.84$$

Righting refl.:

Head . . .	pos. after 41 min with a blood alcohol percentage: 2.92 ‰
Forelimbs . . .	41 , , , , , 2.92 ‰
Hindlimbs . . .	88 , , , , , 2.42 ‰
Spontan. activity . . .	68 , , , , , 2.53 ‰
Chin sign . . . . .	120 , , , , , 2.31 ‰
Ataxia . . . . .	131 , , , , , 2.27 ‰
Nystagmus . . . . .	76 , , , , , 2.48 ‰



Table 2.

Survey of Symptoms in Relation to Blood Alcohol after Intravenous Injection of 2.0-3.25 g Alc pr kg.

Animal nr	Weight g	Dose g/kg	$\beta$ ‰	r	Righting reflexes			Spont. actv. ‰	Chin sign ‰	Ataxia ‰	Nystag- mus ‰
					Head ‰	Forelimbs ‰	Hindlimbs ‰				
5	2350	2.23	0.0043	0.93	3.10	3.10	1.91	1.95	—	—	2.84
9	2700	2.40	0.0054	0.81	2.40	2.10	1.98	2.06	—	—	2.10
10	2700	2.40	—	—	3.20	3.20	3.20	3.20	2.46	2.68	2.46
11	2520	2.80	0.0039	0.75	3.02	2.92	2.74	2.80	2.35	2.35	3.24
12	2970	2.40	0.0041	0.94	3.10	2.88	2.88	2.88	2.28	2.56	2.28
13	3400	2.40	0.0050	0.85	2.82	2.49	2.41	2.41	2.33	2.34	2.41
14	2600	2.35	0.0047	0.89	3.20	3.05	3.05	3.14	2.84	2.84	2.42
15	2455	2.29	0.0046	0.95	2.66	2.50	2.50	2.35	—	2.35	2.35
16	2425	2.40	0.0050	0.92	3.30	2.67	2.64	2.60	2.42	2.54	2.28
17	2430	2.40	0.0043	0.84	2.92	2.92	2.42	2.53	2.31	2.27	2.48
18	2410	2.40	0.0046	0.87	3.04	2.94	2.90	2.90	2.90	2.61	2.61
19	2335	2.40	0.0058	0.76	3.06	3.06	2.84	2.67	2.67	2.64	2.64
20	2870	2.40	0.0040	0.85	3.08	2.80	2.60	2.48	2.59	2.44	2.63
21	2200	3.25	0.0049	0.90	3.22	3.01	3.00	3.03	2.96	2.72	3.22
22	2335	3.25	0.0053	0.89	3.25	3.23	3.10	3.16	2.82	2.30	3.14
Average	2650		0.0048 ± ± 0.0002	0.87 ± ± 0.02	3.02 ± ± 0.06	2.86 ± ± 0.08	2.67 ± ± 0.10	2.68 ± ± 0.10	2.58 ± ± 0.07	2.53 ± ± 0.09	2.60 ± ± 0.09
Stand. deviation			0.0006	0.07	0.24	0.31	0.39	0.39	0.25	0.34	0.35
Stand. deviation in per cent of average			11.7	7.7	7.9	10.8	14.6	14.6	9.8	13.5	13.4

signs that were the most difficult to ascertain as regards intensity and duration, whereas postural nystagmus was to be found in all cases where the alcohol injected was 2 g alc. per kg or more, always with the same characteristic appearance as has already been described, and it seems to be a good criterion of alcohol intoxication.

In view of the uncertainty incident to the ascertainment of the intensity of the symptoms and the individual variations in tolerance, the variation found in the blood alcohol percentages seems to be relatively small: the standard deviation varied from 0.25—0.39 ‰ for the different symptoms, on an average  $\pm 0.32$  ‰ corresponding to  $\pm 12.4$  % of the mean. The head reflex and the chin sign showed the least standard deviations with  $\pm 7.9$  % and  $\pm 9.8$  % respectively. The standard error of the mean was on an average  $\pm 0.08$  ‰, which corresponded to  $\pm 3.1$  % of the average.

It seems to be of greater advantage to relate the symptoms to the prevailing blood alcohol percentage instead of relating them to the quantity of alcohol administered or to the time elapsed. In relation to the time the standard deviation was  $\pm 20$  min, corresponding to  $\pm 35$  % of the average; in relation to the blood alcohol the deviation was considerably less, on an average  $\pm 0.22$  ‰, corresponding to  $\pm 8.2$  % of the average. Both with relation to the quantity and to the time nothing is known as to what extent the variations found are due to changes in absorption, combustion or elimination or to variations in individual tolerance.

The best method for obtaining a conception of alcohol intoxication and its nature will therefore be to follow the symptomatology by means of a number of criteria and to determine the blood alcohol percentage at regular intervals, and finally to relate the symptoms observed to the prevailing blood alcohol percentage.

### Summary.

After intravenous administration of ethyl alcohol in rabbits a number of criteria of the effect as well as the blood alcohol percentage have been followed; the symptoms of intoxication have been related to the prevailing blood alcohol percentage and the variation statistically calculated. Studying alcohol intoxication and its course in different individuals the described method furthers an advantage.

## References.

- ABDERHALDEN, E., and E. WERTHEIMER, *Biochem. Z.* 1927. 186. 252.  
 AGDUHR, E., *Skand. Arch. Physiol.* 1938. 78. 259.  
 ALEXANDROFF, J., and L. TALPIS, *Mschr. Ohrenh.k.* 1928. 62. 1196.  
 ASCHOFF, J., *Z. exp. Med.*, 1938. 103. 350.  
 BAER, G., *Arch. Anat. Physiol. Lpz. Phys. Abt.* 1898. 22. 283.  
 BÁRÁNY, E., (to be published).  
 BERNHARD, C. G., and L. GOLDBERG, *Acta Med. Scand.* 1935. 86. 152.  
 DUSSER DE BARENNE, J. G., *Bumke-Foersters Hdb. Neur.* 1936. II: II: 235.  
 EGGLETON, M. G., *J. Physiol.* 1940. 98. 228.  
 —, *Ibidem.* 1940. 98. 239.  
 FLOURENS, P., *Recherches expérimentales sur les propriétés et les fonctions du system nerveux.* Paris 1824.  
 GETTLER, A. O., and W. A. FREIREICH, *J. Biol. Chem.* 1931. 112. 199.  
 —, *Amer. J. Surg.* 1935. 27. 328.  
 GOLD, H., and J. TRAVELL, *J. Pharmacol.* 1934. 52. 345.  
 HAGGARD, H. W., and L. A. GREENBERG, *Science* 1937. 85. 608.  
 JORPES, E., pers. comm.  
 JOUFFROY, A., and R. SERVEAUX, *Arch. méd. exp.* 1897. 9. 681.  
 KAJIWARA, S., *Recherches sur le mécanisme des troubles de la coordination nerveuse sous l'influence de l'alcool.* Paris 1931.  
 KEESER, E., and H. A. OELKERS, *Arch. exp. Path. Pharmak.* 1937. 186. 606.  
 KLEITMAN, N., and R. MAGNUS, *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1924. 205. 142.  
 —, *Ibidem.* 1924. 205. 148.  
 DE KLEYN, A., *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 1934. 78. 2267.  
 DE KLEYN, A., and C. VERSTEEGH, *Acta otolaryng.*, Stockh. 1930. 14. 356.  
 KLOTZ, H. P., *C. R. Soc. Biol. Paris* 1937. 124. 23.  
 KURÉ, K., T. SHINOSAKI, M. SATO and T. NAGANO, *Z. exp. Med.* 1923. 38. 326.  
 LE BRETON, E., *Signification physiologique de l'oxydation de l'alcool éthylique dans l'organisme.* Lons-le-Saunier 1936.  
 LÉVY, J., *Bull. Soc. Chim. Biol. Paris* 1935. 17. 47.  
 MELLANBY, E., *Medical Res. Comm. Spec. rep.* 1919. 31.  
 MEYER, H. H., *Biochem. Z.* 1935. 276. 174.  
 MOLLESTAD, O., pers. comm.  
 NEWMAN, H. and J. CARD, *J. Nerv. Ment. Dis.* 1937. 86. 428.  
 —, *J. Pharmacol.* 1937. 59. 249.  
 NEWMAN, H. and A. J. LEHMAN, *Arch. int. Pharmacodyn.* 137. 55. 440.  
 —, *J. Pharmacol.* 1938. 62. 301.  
 NEYMARK, M., and E. M. P. WIDMARK, *Skand. Arch. Physiol.* 1936. 73. 260.  
 NICLOUX, M., *Recherches expérimentales sur l'élimination de l'alcool dans l'organisme.* Paris 1900.

- OLOW, J., *Biochem. Z.* 1924. 148. 433.
- ROST, E., and A. BRAUN, *Arb. Reichsgesundh. amt.* 1926. 57. 580.
- ROTHFELD, J., *Arb. Neur. Inst. Wien* 1913. 20. 88.
- SCHOEN, R., *Arch. exp. Path. Pharmac.* 1926. 113. 275.
- SHINOMYIA, M., H. NAGAMI and H. TSUKAMOTO, *J. Orient. Med.* 1932. 16. 33.
- STEINMETZER, K., *Arch. exp. Path. Pharmac.* 1935. 180. 37.
- STÖRTEBECKER, T. P., *Klin. Wschr.* 1937. 16. 302.
- , *Skand. Arch. Physiol.* 1937. 77. 78.
- , *Acta Path. Microbiol. Scand.* 1939. Suppl. 41.
- TURNER, R. G., *J. Pharmacol.* 1932. 44. 305.
- VERSTEEGH, C., *Acta otolaryng., Stockh.* 1922. 4. 394.
- WIDMARK, E. M. P., *Die theoretischen Grundlagen und die praktische Verwendbarkeit der gerichtlich-medizinischen Alkoholbestimmung.* Berlin und Wien 1932.
- , *Biochem. Z.* 1933. 267. 128.
- , *Ibidem.* 1934. 270. 297.
-

# Untersuchungen über die Wirkung von per os zugeführtem Leberextrakt und Ventrikel- schleimhaut auf die Permeabilität der roten Blutkörperchen beim normalen Menschen.

Von

SØREN L. ØRSKOV.

(Eingegangen am 25. August 1941.)

---

BANG und ØRSKOV (1937) haben in einer früheren Arbeit gezeigt, dass die roten Blutkörperchen bei perniziöser Anämie eine abnorme Permeabilität haben und Glukose sehr schnell in die Blutkörperchen eindringt. Die Permeabilität wurde durch Leberbehandlung wieder normal. In einigen Fällen erfolgte diese Beeinflussung erstaunlich schnell, sodass schon eine sehr wesentliche Wirkung nach wenigen Tagen vorhanden war.

Drei Möglichkeiten wurden für den Mechanismus der Wirkung von Leberbehandlung auf die Permeabilität der roten Blutkörperchen in Erwägung gezogen:

1. Das antiperniciöse Prinzip wirkt direkt auf die roten Blutkörperchen.
2. Es werden neue Blutkörperchen mit normaler Permeabilität gebildet.
3. Die Geschwindigkeit, mit der die roten Blutkörperchen zerstört werden, wird vermindert, wodurch Blutkörperchen von mehr normalem Alter und normaler Permeabilität auftreten.

Veilleicht tritt bei der Leberbehandlung der perniziösen Anämie ein Zusammenwirken der erwähnten Möglichkeiten auf. Die sehr schnelle Wirkung auf die Permeabilität, wie sie in einigen Fällen beobachtet wurde, deutet allerdings darauf hin, dass

hauptsächlich die erstgenannte Möglichkeit von Bedeutung ist. Die Wirkung auf die Permeabilität beginnt hier so schnell, dass die Produktion von Reticulocyten noch nicht richtig eingesetzt hat.

Es lag nahe zu untersuchen ob bei normalen Tieren und Menschen bei Leberbehandlung eine Wirkung auf die Permeabilität der roten Blutkörperchen vorhanden ist. Ich habe dies bei Kaninchen vor mehreren Jahren untersucht und keine Wirkung gefunden. Seither ist die Methode zur Permeabilitätsbestimmung weiter verbessert worden (MELDAHL und ØRSKOV 1940) und die Permeierung einer grösseren Zahl von Stoffen an einem grossen Normalmaterial beim Menschen untersucht worden (ØRSKOV).

Im Laufe dieser Untersuchungen hat sich gezeigt, dass grosse individuelle Permeabilitätsunterschiede bei den verschiedenen Stoffen vorhanden sind, die sich über längere Zeit hin recht konstant halten. Weiterhin zeigte eine Untersuchung von YDE und ØRSKOV (1941), dass die schnelle Eindringung der Glukose bei perniziöser Anämie nur im ersten Teil der Permeierung auftritt.

Die vorliegenden Versuche wurden an gesunden Studenten und Mitgliedern des Instituts — insgesamt 17 Personen — ausgeführt. Nach orientierenden Versuchen wurde das antiperniciöse Mittel in verschiedener Menge und über verschiedene Zeit hin eingegeben und die Permeabilität einige Zeit lang geprüft.

Die Permeabilität für folgende 6 Stoffe wurde untersucht: Glycerin, Thioharnstoff, Ammoniumazetat, Hexamethylentetramin, Malonamid und Glukose.

Eine sichere Wirkung wurde für die Permeierung der Glukose gefunden. Indessen konnte in einigen Versuchen bei Behandlung mit grossen Dosen auch eine Beschleunigung der Permeierung des Malonamids beobachtet werden.

Ausser der Permeabilität wurde auch der Haemoglobingehalt wiederholt bestimmt und nur in einem Fall nach Leberbehandlung eine Steigung beobachtet. Es handelte sich hier um eine sonst gesunde Frau (R) mit geringer Anämie, die auf Eisenbehandlung kaum reagierte. Die Blutproben dieser Versuchsperson zeigten schnelle Permeabilität für Glukose, Thioharnstoff und Malonamid, obwohl die Werte nicht ungewöhnlich schnell waren. Entsprechende Veränderungen haben BANG und ØRSKOV für Thioharnstoff und Malonamid auch bei perniziöser Anämie gefunden. Die Permeabilität wurde im vorliegenden Fall einen Monat lang wiederholt untersucht (vergl. ØRSKOV 1941, mit R bezeichnet).



Abb. 1.  $\circ$  = Hb%,  $\triangle$  =  $K_1$ , untere Kurve Reticulocyten in %. Die senkrechten Striche über der oberen Kurve bezeichnen die Eingabe von jeweils 20 g Ventrikulin (MCO).  $\blacksquare$  = 2 cm<sup>3</sup> Exhepa (IDO) intramuskulär und  $\bullet$  = 10 cm<sup>3</sup> Extr. Hepat. fluid. (Alfred Benzon.)

Einige Tage nach dem Beginn der Behandlung wurde weiterhin die Anzahl der Reticulocyten untersucht und nur im Falle R eine deutliche Steigung (bis 6 %) bei Behandlung mit grossen Dosen Leberextrakt gefunden.

Der Versuch mit der Versuchsperson R ist in Abb. 1 wiedergegeben. Die obere Kurve zeigt  $K_1$  für Glukose als Ausdruck für die Geschwindigkeit, mit der die Permeierung vor sich geht bis die Glukosenkonzentration in den Blutkörperchen 25 % derjenigen ist, die in der Blutkörperchensuspensionsflüssigkeit vorhanden ist.

Im übrigen braucht die Methode zur Permeabilitätsbestimmung nicht näher beschrieben zu werden, da sich eine ausführliche Beschreibung bei MELDAHL und ØRSKOV und bei ØRSKOV findet. Es sei nur hervorgehoben, dass eine Verminderung der Konstanten einer Herabsetzung der Permeierungsgeschwindigkeit entspricht.

Da die Veränderung der Permeabilität, die durch antiperniciöse Stoffe bedingt wird, den späteren Verlauf der Permeierung fast nicht beeinflusst, ist  $K_2$  nicht berücksichtigt worden.  $K_2$  ist Ausdruck für die Geschwindigkeit, mit der die Permeierung abläuft, bis die Glukosekonzentration in den Blutkörperchen 75 % der in der Blutkörperchensuspensionslösung vorhandenen Konzentration beträgt. Die Veränderungen von  $K_2$  sind nur einige Prozent.

Die Ausgangswerte für  $K_1$  liegen in Abb. 1 nicht besonders konstant. Nach einer Einspritzung von 2 cm<sup>3</sup> Exhepa intramuskulär und nach Einnahme von täglich 20 g Ventrikulin 6 Tage lang

sinkt  $K_1$  und damit die Permeierungsgeschwindigkeit, nach Ablauf von 2 Tagen auf einem Minimalwert, wo sie bei fortgesetzter Behandlung mit Ventrikulin bleibt.

10 Tage nach Aufhören der Ventrikulineinnahme beginnt  $K_1$  eigentümlicherweise im Anschluss an 2 weitere Ventrikulineingaben zu steigen und erreicht erst nach weiteren 20 Tagen den Ausgangswert. Darauf werden 10 cm<sup>3</sup> Extr. hepat. fluid. (Alfred Benzon; 5 cm<sup>3</sup> sollen 100 g Leber entsprechen) 5 Tage lang eingegeben. Schon nach einem Tag tritt ein erheblicher Fall in der Permeierungsgeschwindigkeit auf, und der niedrigste Wert wird fast erreicht; der Anstieg kommt dann anscheinend schneller, obwohl die Untersuchung nicht so lange nach der Behandlung fortgesetzt wurde. In Abb. 1 ist auch die Wirkung auf den Haemoglobingehalt und auf die Reticulocytenzahl dargestellt. Man sieht, dass besonders in der letzten Versuchsperiode mit Leberextrakt eine Produktion von Reticulocyten auftritt.<sup>1</sup> Nach dem 8. 5. erhielt R täglich 1 cm<sup>3</sup> Leberextrakt aber trotzdem fiel der Haemoglobingehalt und  $K_1$  wurde grösser (Probe am 27. 6.). Dieser Versuch zeigt, dass eine leichte Anämie bei der Permeabilitätsverhältnisse vorhanden sind, die an die bei perniziöser Anämie auftretenden erinnern, durch antiperniciöse Behandlung beeinflusst wird, sodass sowohl ein Anstieg in der Zahl der Reticulocyten und im Haemoglobingehalt auftritt.

Nach den Erfahrungen von BANG und ØRSKOV tritt bei gewöhnlicher Blutungsanämie keine schnelle Permeierung von Glukose auf und möglicherweise kann man auf Grund von Permeabilitätsbestimmung an Blut von Patienten mit einfachen Anämien angeben, welche von Leberbehandlung beeinflussbar sind. Um dieses zu entscheiden, sind natürlich eingehende Untersuchungen dieser Frage notwendig.

Gleichzeitig mit dem Versuch an R wurde ein ganz entsprechender Versuch mit einer männlichen Versuchsperson vorgenommen. Der Versuch wurde nur bis zum 22. 3. fortgesetzt ohne dass eine deutliche Beeinflussung von  $K_1$  gefunden wurde. Dies ist im übrigen der einzige Versuch, bei dem kein deutlicher Fall von  $K_1$  beobachtet wurde.

In Abb. 2 ist ein Versuch dargestellt, wo 5 Tage lang 20 g Ventrikulin gegeben wurde.

Die Wirkung tritt in diesem Versuch langsam ein, erreicht ihr Maximum nach 6—7 Tagen und hört etwa 10 Tage nach der Behandlung auf.

<sup>1</sup> Erythrocytenzahl 4.5 Millionen, Retikulocytenzahl bis 0.27 Millionen.



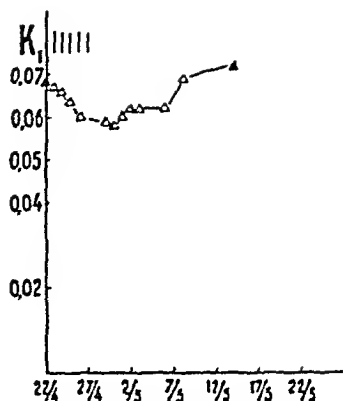


Abb. 2.  $\Delta = K_1$ . Die senkrechten Striche über den Kurven bezeichnen die Eingabe von jeweils 20 g Ventrikulin (MCO).

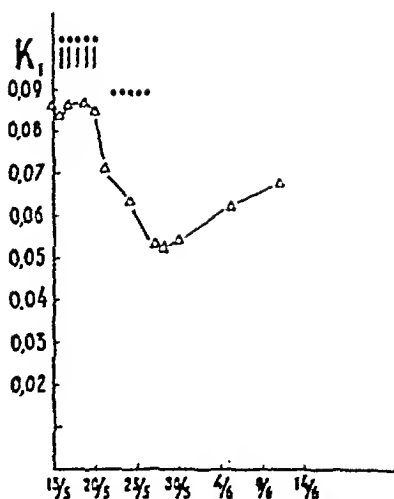


Abb. 3.  $\Delta = K_1$ . Die senkrechten Striche über der Kurve bezeichnen die Eingabe von jeweils 20 g Ventrikulin (MCO).  $\bullet = 5 \text{ cm}^3 \text{ Extr. hepat. fluid. (Alfred Benzon.)}$

In einem anderen entsprechenden Versuch wurde die Maximalwirkung nach 4 Tagen erreicht.  $K_1$  war über 30 % herabgesetzt. Nach weiteren 5 Tagen begann  $K_1$  wieder grösser zu werden. Die Versuche deuten darauf hin, dass das Ausmass der Wirkung und die Zeit, die sie anhält, wesentliche, individuelle Unterschiede aufweist und zu einem gewissen Grade auch von der Grösse des Ausgangswertes für  $K_1$  abhängt.

In zwei Versuchen wurden gleichzeitig Ventrikulin und Leberextrakt eingegeben. Der in den ersten 5 Tagen eingegebene Leberextrakt war nicht der gleiche, der jetzt von Alfred Benzon im Handel ist (der Extrakt enthielt Ausfällungen und 6 cm<sup>3</sup> sollten 100 g Leber enthalten). In beiden Versuchen war so lange das Präparat gegeben wurde keine Wirkung vorhanden, dann aber begann  $K_1$  zu fallen und der Abfall wurde wesentlich durch fünftägige erneute Behandlung mit Leberextrakt (5 cm<sup>3</sup> entsprechen 100 g Leber) verstärkt. Der maximale Fall betrug 39 % in dem in Abb. 3 wiedergegebenen Versuche.

Wie schon aus dem zuerst erwähnten Versuch an der Versuchsperson R hervorging, tritt eine Wirkung auf  $K_1$  selbst bei weiterer Behandlung nicht mehr auf, wenn erst ein Minimalwert erreicht worden ist. In dem in Abb. 4 dargestellten Versuch wurden 6 Tage lang 5 cm<sup>3</sup> Leberextrakt eingegeben. Die Wirkung fängt am

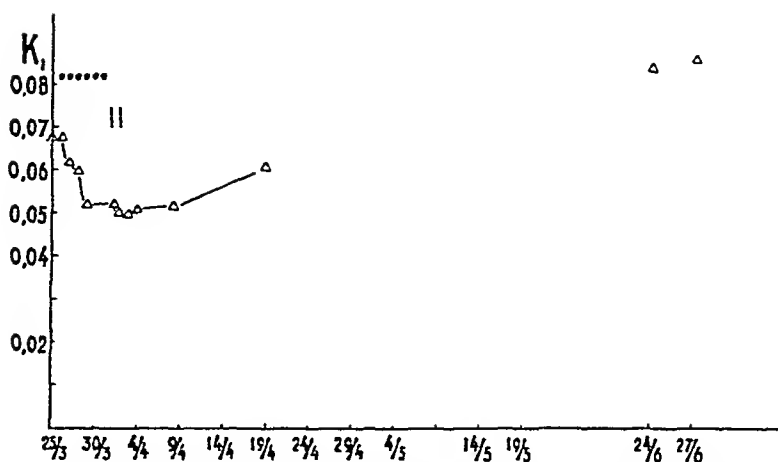


Abb. 4.  $\Delta = K_1$ .  $\bullet = 5 \text{ cm}^3 \text{ Extr. hepat. fluid.}$  Die senkrechten Striche bezeichnen die Eingabe von  $10 \text{ cm}^3 \text{ Extr. hepat. fluid.}$  (Alfred Benzon.)

Tage nach dem Behandlungsbeginn an und erreicht nach 4 tägiger Behandlung einen Minimalwert; nach Ablauf der 6 Tage werden 2 Tage lang  $10 \text{ cm}^3$  Leberextrakt eingegeben, was  $K_1$  nur unwesentlich noch vermindern kann.

Zweifelloos ist die Grösse der Dosis von wesentlicher Bedeutung für die Schnelligkeit mit der die Wirkung eintritt. In 7 Fällen wurde nur an 1 Tag  $10 \text{ cm}^3$  Leberextrakt gegeben und in allen Fällen war eine deutliche Wirkung vorhanden, die ihren Maximalwert mit einer Ausnahme nach Ablauf eines Tages erreicht und mehrere Tage anhalten kann.

In dem in Abb. 5 dargestellten Versuch ist die Wirkung 2 Tage nach der Eingabe verschwunden, in dem Versuch in Abb. 6 dauert die Wirkung mehrere Tage an.

Die hier mitgeteilten Versuche zeigen eindeutig, dass

die Eingabe von Leberextrakt und Magenschleimhaut per os die Permeabilität der Blutkörperchen auch bei normalen beeinflusst, und dass die Wirkung relativ lange nach Aufhören der Eingabe

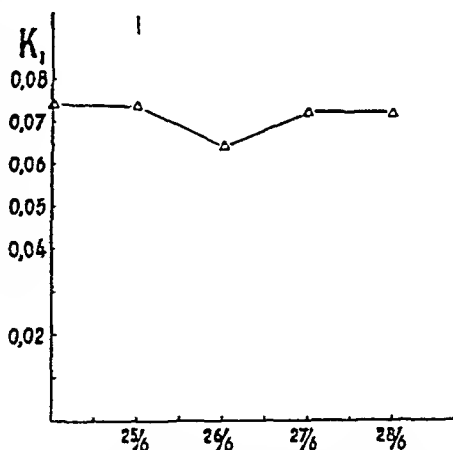


Abb. 5.  $\Delta = K_1$ . Der senkrechte Strich über der Kurve bezeichnet die Eingabe von  $10 \text{ cm}^3 \text{ Extr. hepat. fluid.}$  (Alfred Benzon.)

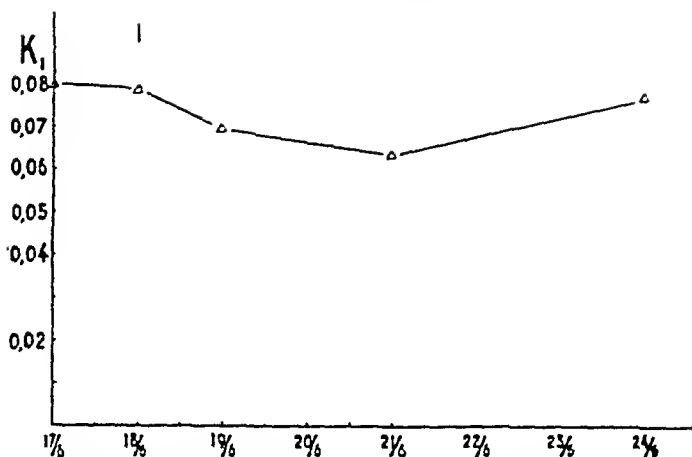


Abb. 6.  $\Delta = K_1$ . Der senkrechte Strich über der Kurve bezeichnet die Eingabe von 10 cm<sup>3</sup> Extr. hepat. fluid. (Alfred Benzon.)

bestehen bleiben kann. Wird eine grossem 200 g Leber entsprechende Einzeldosis gegeben, erhält man eine erstaunlich schnelle Wirkung, die meistens ihr Maximum schon nach einem Tage erreicht, und mehrere Tage anhalten kann.

Da die Wirkung derartig schnell eintritt, und nach so kurzer Zeit keine wesentliche Neubildung von roten Blutkörperchen aufgetreten sein kann, besteht kein Zweifel, dass diese Permeabilitätsänderung durch eine Beeinflussung der in der Blutbahn befindlichen roten Blutkörperchen bedingt ist. Die Versuche zeigen also, dass im Leberextrakt und in der Magenschleimhaut ein Faktor vorhanden ist, der direkt oder indirekt schnell die Permeabilität der roten Blutkörperchen beeinflusst.

Die Versuche lassen nicht entscheiden, ob der Faktor sich in der Leber und im Magen präformiert findet und als solcher resorbiert wird, da ja auch eine hormonale Regulation einsetzen könnte.

Hinsichtlich der Frage, ob es dieser Faktor ist, der bei perniziöser Anämie fehlt, und dessen Zufuhr die Krankheitssymptome beseitigt, sei auf BANG und ØRSKOVs Arbeit verwiesen. Man kann annehmen, dass dieser Faktor, der die Permeabilität beeinflusst bei perniziöser Anämie, wegen der sehr schnellen Permeierung der Glukose bei dieser Krankheit in herabgesetzter Menge vorhanden ist; in gleichem Sinne deutet auch die wesentliche Wirkung, die durch die Behandlung auf die Permeabilität erhalten wird, wodurch die Eindringungsgeschwindigkeit auf den vierten Teil

herabgesetzt werden kann. Die Beobachtungen stützen die Auffassung, nach der die perniciöse Anämie jedenfalls zum Teil durch eine Störung der Membran und mithin auch der Permeabilität der roten Blutkörperchen bedingt ist, zu deren normalen Funktion ein Faktor fehlt. Dieser Faktor kann zweckmässig Permeabilitätsfaktor genannt werden.

Wenn die Permeabilität für Glukose auch beim Gesunden durch Leber- und Magenextrakt erheblich beeinflusst werden kann, muss der Grund hierfür in einer nicht vollständigen Sättigung des Blutes mit diesem Permeabilitätsfaktor liegen, ebenso wie das Blut auch nicht mit Vitaminen und Hormonen gesättigt ist.

Soweit mir bekannt, ist dies der erste Nachweis dass Blutkörperchen in der Blutbahn von einem Stoff beeinflusst werden, der sicherlich physiologische Bedeutung hat.

Es ist naheliegend anzunehmen, dass Permeabilitätsbestimmungen auch beim Normalen zur Standardisierung von Leberpräparaten gebraucht werden können, wenn die Beeinflussung der Permeabilität die beim Normalen nachweisbar ist, durch den antiperniciösen Faktor bedingt ist. Indessen gibt es warscheinlich mehrere Faktoren in der Leber, die für die perniciöse Anämie von Bedeutung sind.

### Zusammenfassung.

Die vorliegenden Versuche zeigen, dass die Einnahme von Leberextrakt und Magenschleimhaut per os auch beim Normalen die Permeabilität der roten Blutkörperchen beeinflusst, und dass diese Wirkung relativ lange bestehen bleibt (bis 1 Monat lang nach der Behandlung). Die Wirkung besteht in einer langsameren Permeierung der Glukose; eine Veränderung dieser Art tritt aber nur im ersten Teil der Permeierung auf.

Nach einer grossen, 200 g Leber entsprechenden Einzeldosis erhält man eine sehr schnelle Wirkung, die meistens am folgenden Tage ihr Maximum erreicht und einen oder mehrere Tage anhalten kann.

Da die Wirkung so schnell auftritt, beruht sie zweifellos auf einer Beeinflussung der Blutkörperchen in der Blutbahn und nicht z. B. auf der Neubildung von Blutkörperchen mit anderer Permeabilität.

Der Haemoglobingehalt und die Reticulocytenzahl wurden mit Ausnahme eines Falles von leichter Anämie von der Behandlung

nicht beeinflusst. In einem Falle von leichter Anämie, die durch Eiseneingabe kaum gebessert wurde, und bei der das Verhalten der Permeabilität an das bei perniziöser Anämie vorhandene erinnerte, trat ein Anstieg im Haemoglobingehalt von 65—83 % auf, und die Reticulocytenwerte stiegen bis auf 6 %.

Es wird erörtert, auf welchem Wege der Wirkung auf die roten Blutkörperchen erfolgt, und im Anschluss an BANG und ØRSKOV's Arbeit wird diskutiert, ob bei der perniziösen Anämie ein Permeabilitätsfaktor fehlt, und ob es dieser Faktor ist, der die roten Blutkörperchen auch beim normalen Menschen beeinflusst.

### Literatur.

- BANG, O. und S. L. ØRSKOV: Hospitalstidende 1937. 80. 141.  
—, J. Clin. Invest. 1937. 16. 279.  
MELDAHL, K. F und S. L. ØRSKOV: Skand. Arch. Physiol. 1940. 83. 266.  
YDE, A. und S. L. ØRSKOV: Acta med. Scand.  
ØRSKOV, S. L.: Diese Zeitschr. 1941. 2. 366.
-

From the Department of Physiology, University of Lund.

## The Action of Bile Salts on Intestinal Peristalsis.

By

NILS EMMELIN.

(Received 29 August 1941.)

---

The fact that ox gall has been used as a purgative since old times and the clinical experience that obstipation often appears in states where the entrance of bile into the intestine is impeded (see further GALAPEAUX, TEMPLETON and BORKON 1938) have led to the assumption that bile exerts a stimulating effect on intestinal peristalsis. SCHÜLEIN (1877) suggested that bile was a physiologically active agent in stimulating peristalsis. The action of bile on intestinal movements has since then been studied experimentally by many authors. Several workers have investigated the effect of bile acids, as these are assumed by e. g. WIELAND (1920), HORRALL (1927), STILL (1929) to be the biologically most active components of the bile. Most observers, however, report results quite contrary to the expected. SCHÜPBACH (1908) experimented on isolated small intestine from cats, suspended in Ringer's solution or in blood. He found that if bile was added to the bath, there ensued a decrease in the intestinal tone and in the size and rate of the pendular movements. D'ERRICO (1910) showed that sodium salts of glycocholic and taurocholic acids had similar effects. Investigations by e. g. YOUNG (1915), MAGERL (1924), LURJE (1926), DAINELLI (1931) TRINCAS (1933) and NAKATA (1933) pointed in the same direction.

These experiments did thus not support the theory that bile stimulated intestinal peristalsis. It must be noted, however, that all these experiments have been performed on isolated in-

testine, and that only tone and pendular movements have been registered, but not peristalsis. It is obvious that bile or bile acids, added to the bath, will chiefly attack the serous layer of the gut. The possibility that the effect of drugs may be different when acting on the mucous than on the serous side of the gut has been stressed by several authors. It has been shown that the inhibitory effect of bile and bile salts on isolated intestine is exerted from the serous and not the mucous side (DAINELLI 1931, TRINCAS 1933, NAKATA 1933). From these observations one may infer that bile, applied inside the gut, would not inhibit motor activity. HANEY, ROLEY and COLE (1939), experimenting on unanaesthetized dogs, fitted with Thiry—Vella loops, found that the propulsion time of a sponge rubber pellet through the loop was shortened, if bile was pipetted into the oral end of the loop just before the insertion of the pellet. In man it has been shown roentgenologically that bile acids, administered orally, shorten the emptying time of the stomach (PANNETT and WILSON 1921, LIERE and NORTHUP 1941).

In the present experiments the effect of some bile acids on peristalsis is investigated by means of an arrangement which permits application of the substances either from the mucous or from the serous side.

### 1. Bile Acids Applied Inside the Gut.

The experiments were performed on isolated guinea pig's intestine in an arrangement devised by BAUR (1923).

A piece of gut of about 10 cm length is isolated, washed and suspended horizontally in a bath, containing oxygenated Tyrode's solution at 38° C. The oral end of the gut is connected through a glass cannula and a rubber tubing with a pressure bottle, containing Tyrode's solution. The anal end is connected with a vertical glass cylinder. The gut is filled with Tyrode's solution from the pressure bottle, and, when a peristaltic wave appears, fluid is propelled into the glass cylinder and moves a float, to which a lever is attached. In the bottom of the glass cylinder an ascending tubing is inserted, the top of which can be adjusted at adequate heights. In this tubing the fluid rises on peristalsis, and if the upper end has been fixed suitably the fluid flows out of the cylinder. In our experiments the fluid was collected and the amount transported by each peristaltic wave measured.

During an experiment the level of fluid in the pressure bottle was kept constant. Also other factors, which might modify the peristalsis — described by BAUR — were kept unchanged.

We investigated the action of sodium glycocholate and taurocholate. It is stated by v. BEZNÁK (1929) and BASU and CHAKRAVARTY (1934) that these bile acids are not split whether by enzymes nor by bacteria in the gut. The response of jejunum as well as of ileum was examined.

Fig. 1 demonstrates the increase in peristalsis after added glycocholic acid. Larger quantities of fluid are propelled through the gut per unit of time, which is due to an increase in the peristaltic rate; the propelling effect of each individual wave is not increased. After about 20 minutes peristalsis decreased in rate and finally disappeared.

Sodium taurocholate acted similar to glycocholate. The lowest active concentration of these two salts was 1:2,000.

The jejunal peristalsis seemed to be more active than the ileal. In both structures the bile salts exerted a stimulating influence.

The distension of the gut is known to be a stimulating factor in peristalsis. It may be assumed that the bile salts act by rendering the stimulating influence of distension in some way or other more effective. This hypothesis was put to test in a series of experiments by means of a method described by STRAUB and VIAUD (1932).

On guinea pigs under urethane a loop of the small intestine is isolated and ligated orally. A cannula is inserted anally and connected with a syringe and a U-shaped water manometer. The system is filled with Tyrode's solution. By means of the syringe the gut can be distended to any desired degree. The manometer registers the intensity of distension as well as the peristaltic movements.

Fig. 2 shows a typical experiment of this kind. It is seen that the threshold pressure, which elicits

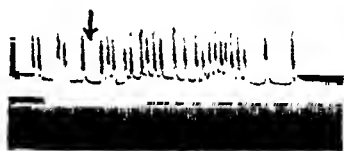


Fig. 1. Loop of isolated guinea pig's jejunum in BAUR's arrangement. Inside pressure amounts to 1.5 cm.  $H_2O$ . From the arrow onwards the perfusion fluid contains sodium glycocholate 1:1000. The individual peristaltic wave propels about 1.3 c. c. Tyrode's solution through the gut. Time signals every 30 seconds.

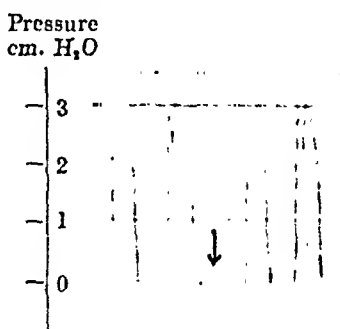


Fig. 2. Guinea pig under urethane. Peristalsis of jejunum registered as by STRAUB and VIAUD. The lowest intensity of distension which elicits peristalsis is established before and after adding bile acid. From ↓ onwards the lumen of the gut contains sodium glycocholate 1:1000.



peristalsis, is not decreased by bile salts in concentrations which in experiments of the previous type augmented peristalsis. The bile acids seem to exert a more direct stimulating action on peristalsis. It will later be demonstrated that the contractibility of the gut is paralyzed by bile salts. The inhibitory effect already alluded to in fig. 1 is probably due to slow diffusion of bile salts from the mucous layer to the smooth muscle. The stimulating effect of bile acids when applied to the mucosa may be due to their stimulating receptors in this membrane, from where impulses may be carried to the nerve cells in Auerbach's plexus, which control peristalsis.

## 2. Bile Salts Applied on the Serous Surface of the Gut.

In these experiments we used BAUR's method, which has been described above. The bile salts were added to the outside fluid in which the gut was suspended.



Fig. 3. Loop of guinea pig's ileum in BAUR's arrangement. From 1 onwards the outside fluid contains sodium taurocholate 1:1000. The gut is washed at 2. Ten minutes passed between the first and the second part of the tracing. During this time no peristaltic waves could be observed. Time in minutes.

Fig. 3 represents a typical experiment. Peristalsis is seen in groups of waves at regular intervals. After adding sodium taurocholate at 1 peristalsis is suppressed until the gut has been washed at 2. This inhibitory effect was obtained by both bile salts here investigated.

With this technique the pendular movements are not recorded by the lever, but they can be observed directly. If bile salts are added from the serous side, one observes that not only



Fig. 4. Piece of guinea pig's ileum, suspended in 2 c. c. Tyrode's solution. The gut was attached to a frontal lever. 1 = 0.1 mg.  $\text{BaCl}_2$ , 2 = 0.01  $\gamma$  histamine, 3 = 0.03  $\gamma$  histamine. From 4 onwards the bath contains sodium taurocholate 1:2000. 5 = 0.03  $\gamma$  histamine, 6 = 0.1 mg  $\text{BaCl}_2$ . The gut is washed and contracts now at 7 on 0.03  $\gamma$  histamine and at 8 on 0.1 mg  $\text{BaCl}_2$ . Time in minutes.

peristalsis but also pendular movements and rhythmic segmentation disappear. The suppression of both these latter types of movements, which are considered to be myogenic, suggests that bile acids act through paralyzing the smooth muscles. This view is supported by the observation that bile acids render the gut insensitive to histamine and barium chloride, which both are known to contract the gut by direct action on the muscle (fig. 4).

### Discussion.

It has been demonstrated that the action of bile acids applied on the mucous side of the gut is contrary to the effect exerted from the serous side. From the outside the effect is inhibitory, which is due to paralysis of the smooth muscles. It is interesting to compare this latter reaction with the observation made by surgeons that when bile during operations on the biliary tract leaks out into the abdominal cavity, motor paralysis of the intestines may follow. Similar findings are published by MATSUURA (1938), who demonstrates that injection of sodium taurocholate into the abdominal cavity on rabbits is followed by motor paralysis of the bowels.

Applied on the mucous side bile salts stimulate peristalsis in concentrations which are many times smaller than in the bile when expelled from the bladder into the gut. It thus seems possible that bile salts play a rôle not only in the chemical digestion and absorption of the food but also in its passage through the gut.

The stimulating effect of bile on peristalsis is by some authors attributed to some indirect mechanism, such as the production of some stimulating agent during the contact between food and bile. From the present experiments, where the gut contains no food, it is clear that the capacity of stimulating peristalsis is inherent in the bile salts.

It may be pointed out that some laxatives also stimulate the expulsion of bile into the gut. This possibly plays a part in their cathartic effect. In this connection it may be interesting to notice that some purgative drugs, f. ex. podophyllin, are believed to act only if bile is present in the intestine.

We have confined these experiments to the bile salts. There are other components in the bile which, when present in adequate concentrations, augment the motor activity of the gut. Choline

in the bile is recently dealt with by WORM (1939) and JOHNSTON, IRVIN and WALTON (1939) and creatinine in the bile by MÜLLER (1940).

### Summary.

It is demonstrated on guinea pig's small intestine that the sodium salts of glycocholic and taurocholic acids stimulate peristalsis when applied on the mucous side of the gut and that they inhibit peristalsis when applied on the serous side.

### References.

- BASU, K. P. and S. CH. CHAKRAVARTY: *Ind. J. med. Res.* 1934, 21, 691 (quoted from *Ber. ges. Physiol.* 1934, 81, 343.)  
 BAUR, M.: *Arch. exp. Path. Pharmac.* 1923, 100, 95.  
 v. BEZNÁK, A.: *Biochem. Z.* 1929, 210, 261.  
 DAINELLI, M.: *Ann. Fac. Med. Perugia* 1931, 31, 137 (quoted from *Ber. ges. Physiol.* 1932, 68, 306).  
 D'ERRICO, G.: *Z. Biol.* 1910, 54, 286.  
 GALAPEAUX, E. A., R. D. TEMPLETON and E. L. BORKON: *Amer. J. Physiol.* 1938, 121, 130.  
 HANEY, H. F., W. C. ROLEY and P. A. COLE: *Ibidem* 1939, 126, 82.  
 HORRALL, O. H.: *Ibidem* 1927, 81, 486.  
 JOHNSTON, CH. G., J. IRVIN and C. WALTON: *J. biol. Chem.* 1939, 131, 425.  
 VAN LIERE, E. J. and D. W. NORTHUP: *Amer. J. digest. Dis.* 1941, 8, 26.  
 LURJE, H. S.: *Arch. Verdauungskrankh.* 1926, 36, 429.  
 MAGERL, C.: *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1924, 202, 509.  
 MATUURA, K.: *Fukuoka Acta Med.* 1938, 31, 26 (quoted from *Ber. ges. Physiol.* 1938, 107, 80).  
 MÜLLER, E.: *Z. Biol.* 1940, 100, 81.  
 NAKATA, H.: *Mitt. Med. Akad. Kioto* 1933, 7, 722 (quoted from Galapeaux, E. A., R. D. Templeton and E. L. Borkon, *Amer. J. Physiol.* 1938, 121, 130).  
 PANNETT, C. A. and C. M. WILSON: *Brit. J. exp. Path.* 1921, 2, 70.  
 SCHÜLEIN, M.: *Z. Biol.* 1877, 13, 172.  
 SCHÜPBACK, A.: *Ibidem* 1908, 51, 1.  
 STILL, E. U.: *Amer. J. Physiol.* 1929, 88, 729.  
 STRAUB, W. and P. VIAUD: *Arch. exp. Path. Pharmac.* 1932, 169, 18.  
 TRINCAS, M.: *Giorn. Clin. Med.* 1933, 14, 428 (quoted from *Ber. ges. Physiol.* 1934, 76, 84).  
 WIELAND, H.: *Arch. exp. Path. Pharmac.* 1920, 86, 79.  
 WORM, M.: *Z. Physiol. Chem.* 1939, 257, 141.  
 YOUNG, A. W.: *Quart. J. exp. Physiol.* 1915, 8, 347.

## The Plasma Prothrombin Level in Cats and Rabbits after Excluding the Liver from the Circulation, after Stimulation of the Splanchnic Nerve and after Intravenous Injection of Adrenalin.

By

BÖRJE UVNÄS.

(Received 25 August 1941.)

---

In 1935 QUICK, STANLEY-BROWN and BANCROFT observed abnormally low blood prothrombin levels in some cases of biliary obstruction. This finding as well as the discovery of vitamin K and its relationship to the prothrombin level in the blood and the device of new and improved methods for determining prothrombin has encouraged intense experimental work on prothrombin formation. The experimental work on animals has chiefly been concerned with the role played by the liver.

SMITH, WARNER and BRINKHOUS (1937) anesthetized dogs with chloroform and found that a deep anesthesia of 1—2 hours duration was followed within 24—48 hours by an abrupt fall in plasma prothrombin, associated with hemorrhages and icterus. In man it has been shown by CULLEN, ZIFFREN, GIBSON and SMITH (1940) that after a chloroform anesthesia of 1—1.5 hours' duration the prothrombin is reduced to 10 % of the normal after 2 to 4 days. BOLLMAN, BUTT and SNELL (1940) have studied the effect of repeated inhalations of carbon tetrachloride on rats. After about 3 weeks' treatment all the animals showed icterus and a marked fall in plasma prothrombin. Autopsy showed intestinal hemorrhages and serious damage to the liver parenchyma.

WARNER (1938) performed partial extirpation of the liver in rats. After removal of about 75 % of the liver some of the animals died within 24 hours and the autopsy frequently showed visceral haemorrhages. A distinct fall in plasma prothrombin occurred in all cases, generally to 20—30 % of the normal. Frequently the fall was maximal already within 6—7 hours. ANDRUS, LORD and MOORE (1939) observed a fall in prothrombin within one hour after total extirpation of the liver in dogs, declining to about 20 % of the normal after about 10 hours. The technique employed was a one-stage method. WARREN and RHOADS (1939), also working on dogs, obtained similar results after total hepatectomy. They used one-stage as well as three-stage methods. Two to four hours after the operation there was a fall in plasma prothrombin, which at the death of the animal — ten to twenty hours after the extirpation — amounted to 10—20 % of the initial level.

Contrary to these authors, DAM, GLAVIND, LEWIS and TAGEHANSEN (1938), after excluding the liver from the circulation, found an increase in the clotting power of the blood. The hepatic vessels in geese were ligated, and the prothrombin was determined by the method of DAM and GLAVIND (1938).

The chief aim of the present investigation is to study the plasma prothrombin level after occlusion of the liver from the circulation under such experimental conditions which as much as possible exclude traumatic insults.

## Methods.

A somewhat modified form of THORDARSSON's (1940, 1941) method has been used for the determination of prothrombin.

This method as well as the one published by SMITH et al. (1934, 1936) allows a determination of relatively small changes of the prothrombin level, which cannot be achieved by the methods used by QUICK (1935, 1938) or by DAM and GLAVIND. QUICK's method only registers changes, when the prothrombin level has declined to 50—60 % of the normal concentration (QUICK). DAM and GLAVIND's method is also too unsensitive in this respect. Only the two first-mentioned methods are applicable in determining prothrombin levels higher than normal.

THORDARSSON estimates the clotting time in a fibrinogen solution, containing a surplus of thrombokinase and an optimal amount of calcium. In this system the clotting time is proportional to the prothrombin concentration in the plasma. The clotting process takes place in a medinal buffer with a pH of 7.4. A short survey of the procedure as used in our experiments is given below.

The clotting process takes place in small test tubes, preferably of the type used for measuring the sedimentation rate. These are placed in a rotatory metal stand ad modum FISCHER (1930) in a water bath of  $37^{\circ}$ . 0.2 c. c. thrombokinase solution, 0.2 c. c. fibrinogen solution, 0.2 c. c.  $\text{CaCl}_2$  solution and 0.2 c. c. medial buffer solution are pipetted into each tube. After two minutes' heating at  $37^{\circ}$  0.2 c. c. diluted plasma, also heated during two minutes at  $37^{\circ}$ , is added. The clotting time is measured. The test tubes are rotated in the metal stand to the horizontal level every 5 seconds, thus making the beginning of clotting easily observable. The following reagents were used:

*Fibrinogen* was obtained from oxalated ox blood through precipitating the blood with saturated ammonium sulphate solution — in the same way as SMITH et al. — and dialyzing it for 24 hours with oxalate- $\text{NaCl}$  solution.

*Thrombokinase.* THORNDARSSON recommends the ox lung as a convenient source of thrombokinase. In this study thrombokinase was obtained from the rabbit's brain, which was shown by QUICK (1935) to be very rich in this enzyme. The brain was cleaned from meninges and superficial vessels, ground to a half-liquid homogenous paste, spread in thin layers on glass plates and left to dry for 24 hours at  $37^{\circ}$ . The dried material is collected and kept in an ice box at  $2-4^{\circ}$ , at which temperature its activity does not diminish for 3—4 weeks. Before using the preparation it is suspended in buffer solution, shaken during 15 minutes at  $37^{\circ}$ , filtered through gauze and finally heated to  $60^{\circ}$  during 3 minutes in order to eliminate a possible contamination by prothrombin. The final solution was kept in ice water during the course of the experiment.

This thrombokinase preparation has a high activity, as a matter of fact considerably higher than that used by THORNDARSSON (1941). In higher concentrations the preparation exerts inhibitory effects, as is shown in fig. 1. The concentration generally used in these experiments corresponded to 1 g. dried cerebral tissue dissolved in 500 ml buffer solution.

*$\text{CaCl}_2$ -solution.* A standard solution was obtained by dissolving  $\text{CaCl}_2$  circa in aq. dest. to 0.250 Mol. This standard solution was diluted ten times before use.

*Buffer solution.* 20.6 g. sodiumdiethylbarbituric acid was dissolved in 1 000 ml.  $\text{CO}_2$ -free aq. dest. 570 ml. of this solution was diluted to 1 000 ml. by adding 0.1 N HCl. This mixture was finally diluted to 2 000 ml. by adding 0.45 %  $\text{NaCl}$ -solution. The pH of the mixture was 7.4.

*Plasma.* Blood was taken from the carotid artery of cats or rabbits in a 2 ml. syringe, containing 0.4 ml. of 3 %  $\text{Na}$ -citrate solution. After centrifuging the plasma during 15 minutes it was put in an ice box at  $2-4^{\circ}$ .

The following plasma concentrations were used: 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 and 5 %. In a few cases with exceedingly low prothrombin level even higher concentrations were used. When calculating the prothrombin level the clotting time is presumed to be proportional to the pro-

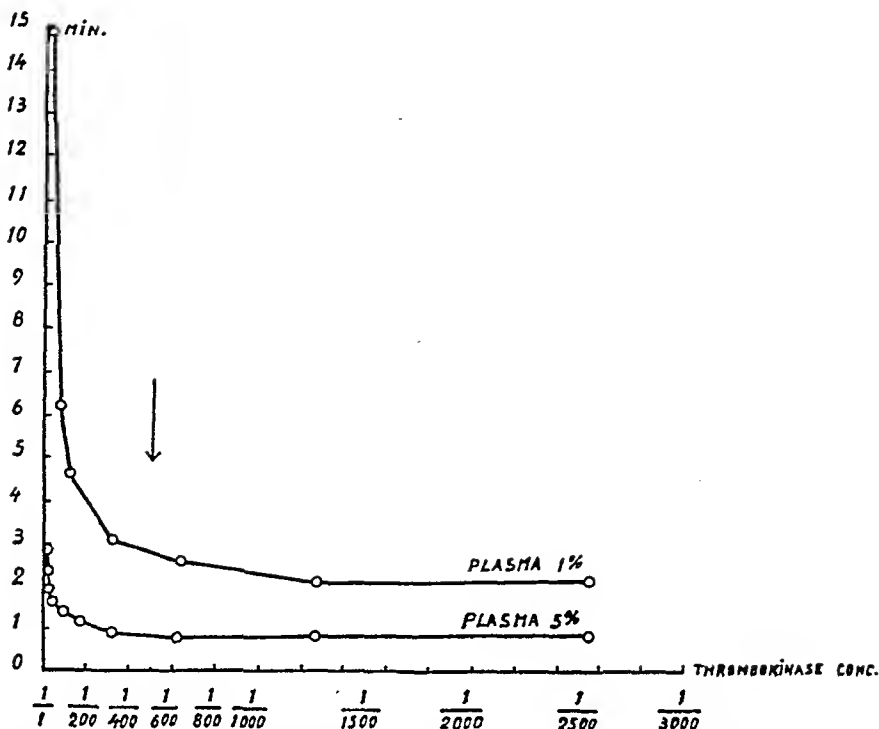


Fig. 1. The ordinato gives the clotting time in minutes, the abscissa g. of dried brain tissue in ml. buffer solution. The figure shows the relation between "pro-thrombin time" and the concentration of the thrombokinas-preparation in 1 % and 5 % cat's plasma. At concentrations above 1/400—1/600 the coagulation is inhibited. The arrow indicates the generally used concentration.

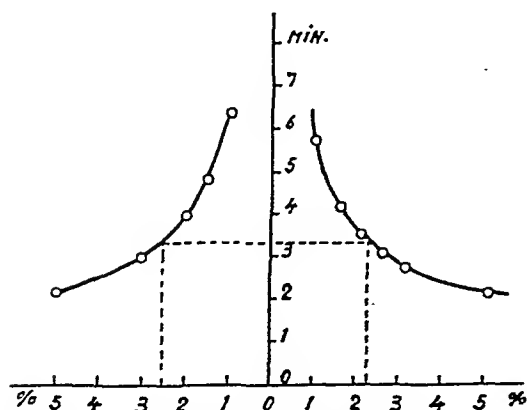


Fig. 2. The ordinato gives the clotting time in minutes and the abscissa the plasma concentration in per cent. The figures from standard plasma dilutions are plotted to the right of the ordinate, the tested plasma to the left. The values are matched at points where the curves begin to separate steeply from the abscissa.

thrombin concentration. Figures from standard plasma and from tested samples are plotted in graphs where the ordinate represents the clotting time in minutes and the abscissa the plasma concentration in per cent. The calculations are made on the principle described by THUNBERG (1936) for enzymatic determination of citric acid (see fig. 2). At every dilution of the standard plasma, three determinations are made, with the unknown plasma two determinations.

## Results.

### A. The Plasma Prothrombin Level after Occlusion of the Liver from the Circulation.

The author observed a rapidly occurring fall in the plasma prothrombin level after excluding the liver from the circulation.

In one type of experiments the portal vein and the hepatic artery were ligated. In a second series the coeliac artery and the superior and inferior mesenteric arteries were at first ligated and

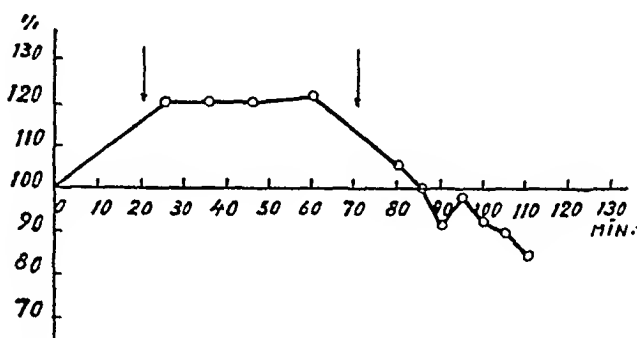


Fig. 3. Cat. 2.7 kg. Ether anesthesia. Fall in prothrombin after ligating art. coeliaca, mes. sup., mes. inf. and v. porta. The left arrow indicates exposure of abdominal vessels, the right arrow ligature of these vessels.

The ordinate gives the prothrombin concentration in per cent of normal, the abscissa the time in hours.

then the portal vein, by which proceeding stasis in the splanchnic region was avoided. The bowels were removed except the proximal duodenal stump with the common bile duct and the rectal ampulla. The liver was thus left in situ and the hepatic veins were not ligated in order to avoid traumata to the liver. (Consequently, in experiments of this type the pancreas and the spleen are excluded from the circulation.)

Three experiments were performed on rabbits under urethane and four on cats under ether anesthesia. The animals survived the operation only for a few hours. In all experiments a successive fall in prothrombin was observed. This was especially obvious in the cats (see fig. 3), which showed a quick fall in prothrombin after the interruption of the hepatic circulation. At the death of the animals the plasma prothrombin was 15–30 % below the initial level.



These results indicate that the capacity of the body to maintain the prothrombin level in the blood momentarily is put out of action when the liver is eliminated. The possibility that the evisceration and the involved operative traumatization caused the fall in prothrombin was excluded by extirpation of only the small and large intestines. In order to secure an adequate blood supply to the liver the hepatic artery was left intact and the portal vein was ligated distally to the gastro-splenic vein. In five experiments of this type the prothrombin level did not decline during

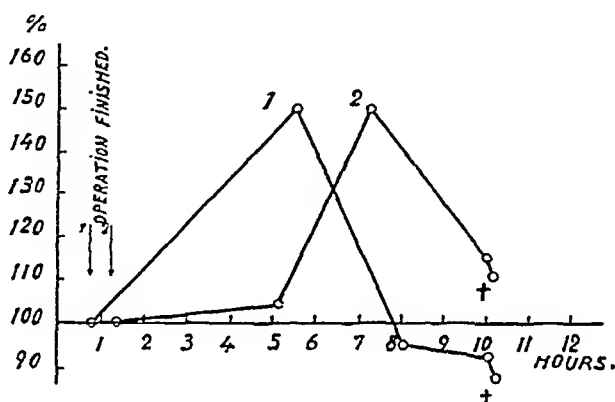


Fig. 4. In two cats the intestines are removed with the hepatic artery left intact and the portal vein ligated distally to the gastrosplenic vein. The spleen is left intact.

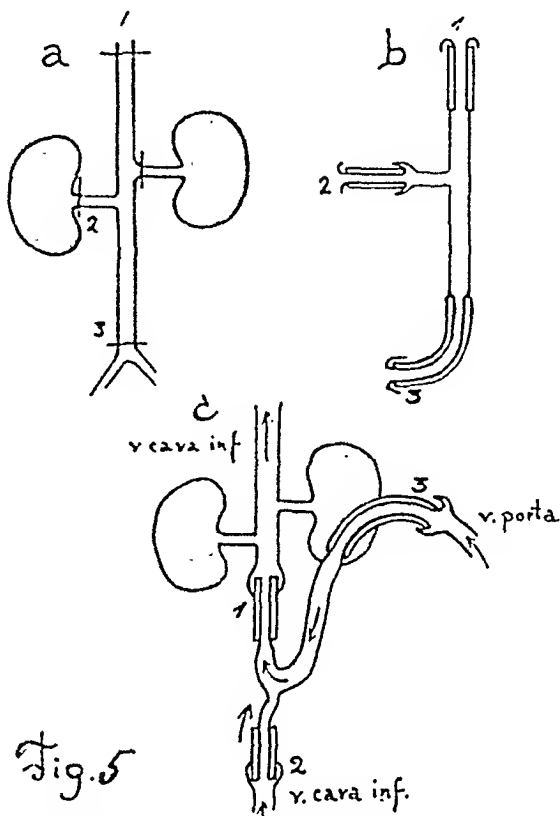
The ordinate gives the prothrombin concentration in per cent of normal, the abscissa the time in hours.

6—8 hours after extirpation of the intestines (see fig. 6). In two experiments where the spleen was left in situ a transient but significant increase of the prothrombin concentration (see fig. 4) and, corresponding to this phenomenon, an augmented clotting tendency was observed. GRAY and HUNT (1914) also observed an increased rate of clotting after extirpation of the intestines in cats. In experiments where also the spleen was extirpated no increase in prothrombin concentration could be observed (see fig. 6).

The liver can be excluded from the circulation by means of an Eck's fistula. In this arrangement the portal blood is conveyed past the liver by an anastomosis between the portal vein and the vena cava inf.

The author has devised a method for performing this anastomosis in cats without any kind of mechanical trauma to the liver. By this technique an extirpated piece of the inferior vena cava by means of small glass cannulas is switched in between the portal vein and the abdominal vena cava of another cat. The vena cava of a newly killed cat is extirpated from a point as near as possible to the liver to a point just above the union of the common iliac veins (fig. 5 a). All afferent veins except one renal vein are previously ligated.

This connecting instrument is now fixed as seen in fig. 5 c. The portal vein is connected with the distal end of the cannula (3) and the proximal stump of the vena cava with the proximal branch of the cannula (1), while the venous blood flow from the lower part of the body is conveyed through the renal branch of the cannula (2). About 10–20 minutes are required to perform this rearrangement of the circulation. The stasis in the portal region, following the operation disappears quickly and the guts regain a good colour. Before closing the abdomen the hepatic artery is ligated.



In three experiments of this type a fall in prothrombin appeared 2–4 hours after the operation, progressing successively until the death of the animal after about 10–15 hours. No visceral hemorrhages could be observed. Fig. 6 gives the result of such an experiment with a fall in plasma prothrombin within 15 hours to about 25 % of normal.

As the blood samples were taken from the carotid artery it was necessary to anesthetize the cat several times during an experiment. These repeated anesthetics caused a deterioration of the general condition of the cat. The prothrombin level however did

not change significantly within 24 hours as was demonstrated in special experiments.

The disappearance of prothrombin from the plasma after the occlusion of the liver is strikingly rapid. RHOADS (1940) suggests that this must be due to some mode of destruction of the prothrombin within the organism. He refers to the findings of ANDRUS,

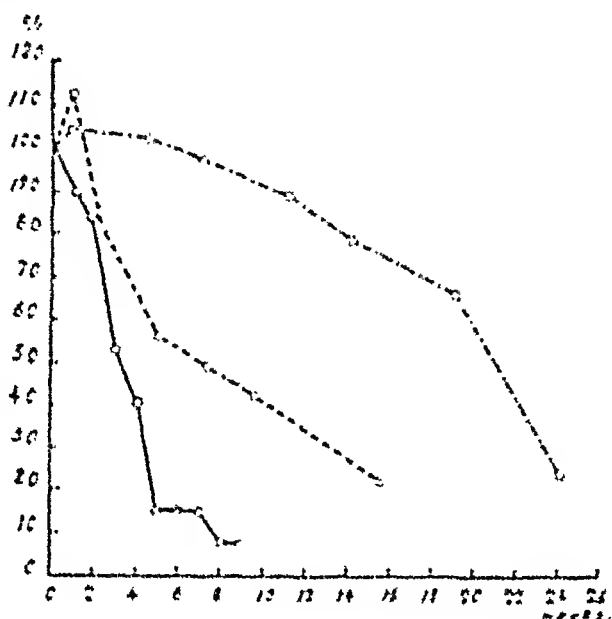


Fig. 6. — — — Cat, 3.5 kg. Ether anesthesia. Prothrombin level after removing the intestines. The hepatic artery and the gastrosplenic vein are left intact.

— · — · — Cat, 3.5 kg. Ether anesthesia. Prothrombin level after modified Eck's fistula.

———— Citrated cat's blood circulating in perfusion apparatus at 37°.

The ordinate gives the prothrombin values in per cent of the normal, the abscissa the time in hours.

LORD and KAUFER (1940) that the blood from the pulmonary veins contains smaller amounts of prothrombin than the blood from the pulmonary arteries. Thus a destruction of prothrombin might take place in the pulmonary circulation.

Several investigators have studied the reduction of blood prothrombin in vitro. These experiments have been performed with a view chiefly to determine the therapeutic value of stored blood in hemorrhagic conditions. Very divergent results have been obtained. RHOADS and PANZER (1939), when working with QUICK's method, observed a relatively rapid fall in prothrombin.

In spite of storing in ice boxes the prothrombin level decreased within three days to about 50 % of the normal and within one week to below 30 %. QUICK (1940) obtained similar results. Other workers, using the method of SMITH et al. found a much slower fall in prothrombin. LORD and PASTORE report that the activity is still 60 % after three weeks and ZIEGLER, OSTERMANN and HOVIG (1940) give similar figures. BINDSLEY and THORDARSSON (1940), using THORDARSSON's method found, contrary to all other workers, no fall but rather a small increase in the prothrombin values during the first 30—39 days.

We performed some experiments in order to investigate the destruction of prothrombin in the circulating blood. Cat's blood was propelled through a perfusion system including a DALE-SCHUSTER pump and an oxygenator. The blood was allowed to circulate in the pump at 37°. As can be seen

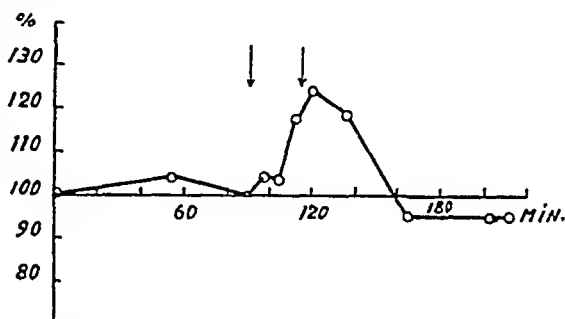


Fig. 7. Cat. 3.8 kg. decerebrate. Between the arrows slow injection of adrenalin 0.43  $\gamma$  per kg. and minute.

The ordinate gives the prothrombin concentration in per cent of the normal and the abscissa the time in minutes.

from fig. 6 the fall in prothrombin under these conditions was even quicker than that found in vivo after application of an Eck's fistula. In order to explain the rapid fall in plasma prothrombin after occlusion of the liver, it is thus not necessary to assume a specific destruction mechanism within the organism. The possibility still remains that prothrombin is eliminated more quickly in citrated blood.

In some experiments cat's liver was perfused with vitamin K (2-methyl-1.4-naphthoquinone succinate) in concentrations varying between 10—100 mg/200 ml. citrated blood. No formation of prothrombin could be observed. The prothrombin was reduced at the same rate as in experiments with perfusion without vitamin K.

## B. The Plasma Prothrombin Level after Intravenous Injection of Adrenalin and after Stimulation of the Splanchnic Nerve.

It has long been known that adrenalin shortens the clotting time of the blood. CANNON and GRAY (1914) suggest that adrenalin acts by liberating some agent which promotes clotting from the liver into the circulation. CANNON and MENDENHALL (1914) observed a hastening of the clotting mechanism after stimulating afferent nerves and during operations under light ether anesthesia. The effect was supposed to depend upon a secretion of adrenalin, elicited via the splanchnic nerves. An accelerated coagulation was also observed by experimental stimulation of the splanchnic nerves before but not after extirpation of the adrenals. MENDENHALL (1915) also showed that ether anesthesia shortens the clotting time.

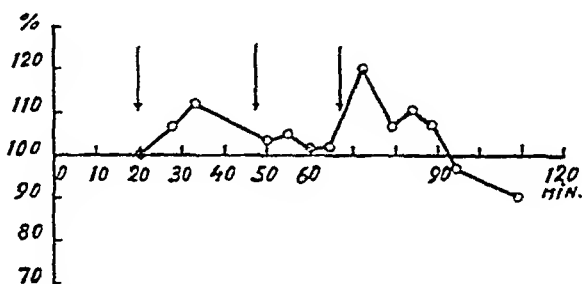


Fig. 8. Cat. 3.5 kg. Ether anesthesia. The arrow to the left marks beginning of the operation, the second arrow exposure of the splanchnic nerve and the third arrow electrical stimulation of the left splanchnic nerve during two minutes.

The ordinate gives the prothrombin concentration in per cent of the normal, the abscissa the time in minutes.

GRABFIELD (1917), using HOWELL's (1914) method, suggested that the increased coagulation tendency in these experiments was due to an increased prothrombin concentration in the blood. In the author's experiments a rise in the prothrombin level was observed during and after the operation. Slight ether anesthesia was especially effective. The increase varied between 10–20 % of the normal and remained on a higher level for about half an hour.

In our experiments intravenous injections of adrenalin are followed by an increase in the prothrombin concentration of the blood, thus confirming GRABFIELD's observations. This effect was seen as well after quick as after slow injections of adrenalin

in doses varying between 1—10  $\gamma$  per kg. During prolonged injections the prothrombin values returned to normal after 10—15 minutes in spite of continued administration of adrenalin. The increase generally amounted to 20—30 % of the initial level. No increase was observed in cases where the prothrombin level was initially supranormal due to the operation being performed under light ether anesthesia. In these animals sometimes even a decline of the prothrombin was observed.

Electrical stimulation of the splanchnic nerve in cats resulted in a similar transient increase in prothrombin to 20—30 % above the normal (fig. 8).

Adrenalin in the system here employed, had no accelerating effect on the coagulation in vitro.

### Discussion.

Experimental work concerning the role played by the liver in prothrombin formation has chiefly been performed along two lines. The plasma prothrombin level and the response to vitamin K has been studied after poisoning the animals with drugs especially toxic to the liver, or after hepatectomy.

WILLIAMSON and MANN (1923) warn for drawing too definite conclusions about the role of the liver from experiments with liver poisons. These authors call attention to the divergent results obtained after experimental intoxications of the liver and after hepatectomy. The general intoxication of the body causes too many uncontrollable disturbances in the metabolic processes of the various organs.

Hepatectomy on the other side involves considerable traumatization of the liver and disturbances in the portal circulation. LORD (1939) has shown on dogs that already "rough manual handling" of the liver during 25 minutes reduces the prothrombin level to about 70 %. The level remains low during 3—5 days. Similar though more transient effects were obtained after traumata to the spleen or to the kidneys. ZIEGLER et al. (1940) also stress the significance of the trauma and consider the postoperative fall in prothrombin after cholecystectomy and other abdominal operations as being due to operative traumatization of the liver.

The present experiments have been performed under conditions which practically exclude traumatic insults to the liver. In spite of this caution the exclusion of the liver from the circulation re-

sulted in a quick fall in plasma prothrombin. This corresponds to earlier results obtained after liver extirpations in dogs and rats and supports the theory of the intimate relation of the liver to the prothrombin formation. The mechanism involved remains obscure. It is not established that the liver forms prothrombin. A suggestion that the solution of these problems is to be sought for not only in the liver, is given in experiments published by STEWART (1941). He demonstrates cases of hypoprothrombinaemia in ulcerative colitis, steathorrhoea, lupus disseminatus, perinephritic abscess, periarteritis nodosa etc., where in spite of an evidently intact liver no satisfactory increase in plasma prothrombin could be obtained even after great doses of vitamin K. Similar results are reported by THORDARSSON (1941) in myeloid leukaemia, pernicious anemia etc.

It is further not known, if the liver has mobilizable reserves of prothrombin and if, for the formation of prothrombin, a continuous supply of vitamin K is necessary. Clinical as well as experimental facts indicate, that a relatively normal prothrombin level can be maintained in spite of a minimal or suppressed vitamin K supply [SMITH, WARNER, BRINKHOUS and SEEGER (1938), GRAVES (1939)]. In these conditions an endogenous, bacterial formation of substances with vitamin K activity in the colon is supposed to prevent avitaminosis.

If the liver depends on a continuous supply of vitamin K from the gut for the regulation of the plasma prothrombin level, the extirpation of the gut might result in a successive decline in plasma prothrombin. Extirpation of the intestines — the hepatic artery is left intact and the portal vein ligated distally to the gastro-splenic vein — did not change the prothrombin level during the first 6—8 hours. After this a successive decline began, which reached considerable values within 24 hours (fig. 6). The hepatic artery is considered to furnish only about 30 % of the total oxygen supply of the cat's liver [Mc MICHAEL (1937)]. It is thus likely that the fall in prothrombin is caused by a reduction of the parenchymal activity, secondary to the diminished blood supply to the liver and not due to the loss of vitamin K supply. The changes in prothrombin observed in experiments where an anastomosis between the abdominal vena cava and the portal vein was established in order to avoid parenchymal damages to the liver, were unfortunately not regular enough to decide whether a fall in prothrombin could be checked through augmenting the blood supply to the liver.

### Summary.

The plasma prothrombin level was studied in cats and rabbits after occlusion of the liver from the circulation with special care taken to avoid traumatization of the liver.

The occlusion of the liver was performed in two ways, either by ligating the hepatic vessels in cats and rabbits or by applying a modified Eck's fistula in cats. A rapid fall in plasma prothrombin was observed in all cases.

After removing the intestines in cats the prothrombin level remained unchanged during 6—8 hours whereupon a quick fall in prothrombin ensued. If the spleen was left intact even a transient, but considerable increase in prothrombin, accompanied by an augmented coagulation tendency was found.

In experiments *in vitro* with citrated blood, the prothrombin decreased at a higher rate than in experiments *in vivo*, where the liver was excluded from the circulation.

Increased plasma prothrombin levels were observed in cats under slight ether anesthesia, after intravenous injections of adrenalin and after electric stimulation of the splanchnic nerve.

### References.

- ANDRUS, W. D., J. W. LORD and KAVER, *Science* 1940, *91*, 48.  
—, J. W. LORD and R. A. MOORE, *Surgery*, 1939, *6*, 899.  
BINDSLEV, A., and O. THORDARSSON, *Nord. Med.* 1940, *8*, 2403.  
BOLLMAN, J. L., H. R. BUTT and A. M. SNELL, *J. Amer. Med. Ass.* 1940, *115*, 1087.  
CANNON, W. B., and H. GRAY, *Amer. J. Physiol.* 1914, *34*, 225.  
—, and W. L. MENDENHALL, *Ibid.* 1914, *34*, 251.  
CULLEN, S. C., S. E. ZIFFREN, R. B. GIBSON and H. P. SMITH, *J. Amer. Med. Ass.* 1940, *115*, 991.  
DAM, H., and J. GLAVIND, *Acta Med. Scand.* 1938, *96*, 108.  
—, J. GLAVIND, L. LEWIS and E. TAGE-HANSEN, *This Arch.* 1938, *79*, 121.  
FISCHER, A., *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1930, *225*, 737.  
GRABFIELD, G. P., *Amer. J. Physiol.* 1917, *42*, 46.  
GRAY, H., and K. L. HUNT, *Ibid.* 1914, *34*, 332.  
GREAVES, J. D., *Ibid.* 1939, *125*, 429.  
LORD, J. W., *Surgery* 1939, *6*, 896.  
—, and J. PASTORE, *J. Amer. Med. Ass.* 1939, *113*, 2231.  
MC MICHAEL, J., *Quart. J. exp. Physiol.* 1937, *27*, 38.  
MENDENHALL, W. L., *Amer. J. Physiol.* 1915, *38*, 33.



- QUICK, A. J., Ibid. 1935, *114*, 282.  
—, J. Amer. Med. Ass. 1938, *110*, 1658.  
—, Ibid. 1940, *114*, 342.  
—, M. STANLEY-BROWN and F. W. BANCROFT, Amer. J. med. sci. 1935, *190*, 501.  
RHODAS, J., Ann. Surg. 1940, *112*, 568.  
—, and L. M. PANZER, J. Amer. Med. Ass. 1939, *112*, 309.  
SMITH, H. P., E. D. WARNER and K. M. BRINKHOUS, Amer. J. Physiol. 1934, *107*, 63.  
—, E. D. WARNER and K. M. BRINKHOUS, J. exp. Med. 1937, *66*, 801.  
—, E. D. WARNER, K. M. BRINKHOUS and W. H. SEEGER, Ibid. 1938, *67*, 911.  
STEWART, J. D., Surgery 1941, *9*, 212.  
THORDARSSON, O., Nord. Med. 1940, *5*, 86.  
—, Undersøgelser over prothrombin (Köpenhamn) Aarhus 1941.  
THUNBERG, T., Abd. Hdb. biol. Arb.meth. 1936, Abt. 4, Teil 2, s. 2017.  
WARNER, E. D., J. exp. med. 1938, *68*, 831.  
—, K. M. BRINKHOUS and H. P. SMITH, Amer. J. Physiol. 1935, *114*, 667.  
WARREN, R., and J. E. RHODAS, Amer. J. med. Sci. 1939, *198*, 193.  
WILLIAMSON, C. S., and F. C. MANN, Amer. J. Physiol. 1923, *65*, 267.  
ZIEGLER, E. R., A. E. OSTERBERG and M. HOVIG, J. Amer. Med. Ass. 1940, *114*, 1341.
-

Aus der pharmakologischen Abteilung des Karolinischen Institutes,  
Stockholm.

## Die Wirkung von Carbaminoylcholin und Acetyl- $\beta$ -Methylcholin auf Herzminutenvolumen und Atmung des gesunden Menschen.

Von

L. GOLDBERG und G. LILJESTRAND.

(Eingegangen am 4. September 1941.)

---

Die Cholinester werden pharmakologisch durch drei Gruppen von Wirkungen ausgezeichnet, die in wechselndem Umfange vorhanden sind: sie sind parasympathicomimetisch, sie haben einen nikotinähnlichen Effekt (Reizung der autonomen Ganglien), der erst nach Atropinisierung deutlich hervortritt, und sie sind vasodilatatorisch wirksam. Die Beeinflussung des Kreislaufs ist deshalb komplizierter Art. Die gefässerweiternde Wirkung machte es unserer Meinung nach wahrscheinlich, dass sie unter Umständen auch eine Vergrößerung des allgemeinen Blutstromes bewirken werden, wie das für eine Reihe anderer vasodilatatorisch wirkender Mittel gefunden wurde: für Amylnitrit von LINDHARD (1915), für Natriumnitrit von GAISBÖCK und JARISCH (1927) und für Histamin von v. EULER und LILJESTRAND (1929).

Versuche in dieser Richtung wurden zuerst von ELLIS und WEISS (1932) mit Acetylcholin ausgeführt. Sie benutzten hauptsächlich die kontinuierliche intravenöse Injektion von 0.02—0.14 g pro Min. und beobachteten danach Hautröte an Kopf und Oberkörper, Schweißsekretion, Speichel- und Tränenfluss. Die Pulsfrequenz wurde nicht beeinflusst oder unbedeutend erhöht, der Blutdruck nur in 3 von 14 Fällen merkbar herabgesetzt. Intravenöse Zufuhr von 0.056—0.07 g pro Min. bewirkte in 5 Fällen eine leichte Zunahme des Standardstoffwechsels (im Mittel etwa 7 Prozent), während das Herzminutenvolumen, bestimmt mit

Grollmans Acetylenmethode, nicht sicher geändert wurde. Die ausserordentliche Unbeständigkeit des Acetylcholins lässt dieses Ergebnis verständlich erscheinen; wie GROLLMAN (1932) hervor-gehoben hat, war aber die Genauigkeit bei den Herzminuten-volumenbestimmungen nicht gross genug, um kleine Differenzen zu erfassen. CARMICHAEL und FRASER (1933) sahen nach intra-venöser Injektion von 0.01—0.03 g Acetylcholin während einiger Sekunden Verlangsamung der Herzfrequenz mit Blutdruck-senkung; dann schlug das Herz rascher als vor der Injektion, während der Blutdruck zur ursprünglichen Höhe oder etwas dar-über zurückkehrte. Subkutane oder intramuskuläre Injektionen von 0.5 g waren unwirksam.

Neue Versuche sind mit relativ stabilen Cholinderivaten aus-geführt worden. Ausserordentlich kräftig wirksam ist das Carbam-inoylcholin, das bei intravenöser Injektion schon in Dosen von 0.03—0.05 mg Blutdrucksenkung und Erhöhung der Pulsfrequenz bewirkte (FRASER 1938). Nach subkutaner und intramuskulärer Injektion von 0.25—0.5 mg entstanden eine Reihe von Sympto-men. In diesem Zusammenhange erwähnen wir nur die Kreis-laufeffekte: Röte von Gesicht, Hals und Oberkörper, Hitzegefühl, Erhöhung der Pulsfrequenz und Senkung des Blutdruckes. Nach etwa 5 Minuten fiel aber die Pulsfrequenz unter den Ausgangs-wert, der erst nach etwa 40 Minuten wieder erreicht wurde. STARR (1937) hat an 26 gesunden Studenten nach 0.1—1 mg subkutan, bzw. 0.4—1.0 mg peroral, ähnliche Wirkungen beobachtet, die Pulsfrequenz ging aber nur in einzelnen Fällen unter dem Aus-gangswert. 6 Fälle wurden etwas eingehender studiert. Nach subkutaner Zufuhr von 0.5 mg stieg die Pulsfrequenz im Durch-schnitt um 7.6 Prozent, während der mittlere Blutdruck um 6.2 Prozent abnahm. Der Standardstoffwechsel zeigte eine Erhöhung um 3.5 Prozent, das Herzminutenvolumen, bestimmt mit der Äthyljodidmethode, um 12.3 und das Respirationsvolumen um 5.6 Prozent. Es wird aber besonders betont (vgl auch STARR, GAMBLE, MARGOLIES, DONALD, JOSEPH und EAGLE [1937]), dass die in den individuellen Fällen gefundenen Werte für das Herzminutenvolumen so grosse Schwankungen aufwiesen, dass die Differenzen nicht signifikativ waren.

Das Acetyl- $\beta$ -Methylcholin wirkt wesentlich schwächer als das Carbaminoylcholin, ruft aber ebenfalls ziemlich anhaltende Effekte hervor. STARR, ELSOM und REISINGER (1933) gaben ihren Nor-malpersonen 2.5—25 mg subkutan und erhielten dabei leichte

Blutdrucksenkung, verstärkte Atmung und erhöhte Pulsfrequenz als beinahe konstante Symptome. Oft wurde die Pulsfrequenz nachher langsamer als in der Kontrollperiode. Über ähnliche Beobachtungen berichtet FRASER (1938). Nach peroraler Zufuhr bekamen die erstgenannten Verfasser schwächere und langsamer einsetzende Wirkung. In zwei Versuchspersonen bewirkten 200 und 400 mg peroral keine Wirkung auf Atmung und Herzminutenvolumen, bestimmt mit der Äthyljodidmethode. In diesen zwei und noch zwei anderen Versuchspersonen wurde auch der Standardstoffwechsel festgestellt. In zwei Fällen blieb er unverändert, in den beiden anderen fiel er beträchtlich. Da die eine dieser Versuchspersonen keine Änderung des Stoffwechsels nach subkutaner Zufuhr darbot, kann nach der Meinung von STARR, ELSOM und REISINGER die Wirkung nicht von dem Acetyl- $\beta$ -Methylcholin abhängen. WEISS und ELLIS (1934) haben auch mit dieser Substanz kontinuierliche intravenöse Injektionen ausgeführt; unter Verwendung der Cyanidmethode kamen sie zu dem Ergebnis, dass die Cirkulationszeit unverändert blieb.

Das Carbaminoyl- $\beta$ -Methylcholin oder  $\beta$ -Methylcholinurethan soll eine Mittelstellung zwischen dem Carbaminoylcholin und dem Acetyl- $\beta$ -Methylcholin einnehmen, indem die nikotinähnliche Wirkung, die bei dem Carbaminoylcholin stark und bei Acetyl- $\beta$ -Methylcholin verschwunden ist, hier schwach entwickelt ist. Die allgemeine Giftigkeit befindet sich zwischen derjenigen der beiden anderen. Auch mit dieser Substanz sind Bestimmungen der Wirkung auf das Herzminutenvolumen ausgeführt worden (STARR und FERGUSON 1940). 3—8 mg, subkutan injiziert, hatten keine sichere Wirkung.

Zusammenfassend ergibt sich demnach, dass von den bisher untersuchten Cholinderivaten keine sichere Vergrößerung des Herzminutenvolumens bei gesunden Versuchspersonen erzielt wurde. Neue Bestimmungen schienen uns deshalb angebracht. Eine Erregung der Atmung ist dagegen mehrmals beobachtet worden.

### Methodik.

Unsere Versuche wurden unter Standardbedingungen an drei männlichen Versuchspersonen ausgeführt. Die allgemeine Anordnung der Versuche war dieselbe, die früher beschrieben wurde (LILJESTRAND und NYLIN 1941 a). Sauerstoffverbrauch, respiratorischer Quotient, Pulsfrequenz, Herzminutenvolumen und Blutdruck wurden in dort angegebener Weise festgestellt, bei den raschen Veränderungen mussten wir

aber oft auf die Blutdruckmessungen kurz nach der Verabreichung der zu prüfenden Mittel verzichten. Im übrigen waren die Blutdruckwirkungen recht unbedeutend, und wir sehen aus Raummangel von ihrer Mitteilung zum grossen Teil ab.

Die von uns benutzten Präparate waren Mercks Doryl (Carbaminoylcholinchlorid) und Mecholyl (Acetyl- $\beta$ -Methylcholinchlorid).

## Resultate.

### Carbaminoylcholin.

Wurden 0.25—0.35 mg Doryl einer Versuchsperson subkutan verabreicht, entstanden innerhalb weniger Minuten die bekannten Kreislauferscheinungen, wie Gesichtsröte, Wärmegefühl, Pulsbeschleunigung und Blutdrucksenkung, und etwa gleichzeitig traten lebhafte Schweissabsonderung und vermehrte Salivation ein. Auch Atmungsbeschleunigung wurde oft beobachtet. Diese Erscheinungen gingen aber rasch zurück und waren nach 20—30 Minuten fast verschwunden. In Übereinstimmung hiermit zeigte das Herzminutenvolumen ebenfalls rasche Änderungen. Dies geht aus den Tabellen 1 und 2 hervor.

Die Normalwerte für Sauerstoffverbrauch, Pulsfrequenz und Herzminutenvolumen bei L. G. stimmen ausgezeichnet mit den für diese Versuchsperson früher mitgeteilten Werten überein (LILJESTRAND und NYLIN 1941 b). Für die beiden anderen Versuchspersonen sind die Werte entsprechend ihrem höheren Körpergewicht etwas grösser und stimmen ebenfalls gut mit den gewöhnlichen Standardwerten überein. Der respiratorische Quotient ist etwas unregelmässig, was wahrscheinlich dadurch bedingt wird, dass die Versuchspersonen keine grosse Übung hatten, durch Mundstück zu atmen. Nach der Injektion stieg der Sauerstoffverbrauch regelmässig, in mehreren Fällen fiel das Maximum, das 7—15 Prozent über dem Standardwert lag, innerhalb der ersten halben Stunde, in anderen kam es etwas später. Das Minutenvolumen des Herzens zeigte in der ersten Probeperiode eine deutliche Erhöhung, die im Mittel bei L. G. 14, bei S. B. 16 und bei W. D. 33 Prozent des Standardwertes betrug. Diese Wirkung ging aber schnell zurück, und die Werte der zweiten halben Stunde nach der Injektion zeigten gegenüber der Norm keine Änderung. Die Pulsfrequenz war in mehreren Fällen kurz nach der Injektion deutlich erhöht, in der späteren Periode war sie aber normal oder etwas verlangsamt. Für den respiratorischen Quotienten bestand

Tabello 1.  
Versuche mit subkutaner Injektion von 0.25 mg Doryl bei L. G. (30 J., Gew. 60 kg).

Vor- suchs- tag	Vor der Injektion					10—30 Min. nach der Injektion					40—60 Min. nach der Injektion				
	O <sub>2</sub> -Ver- brauch ml pro Min.	Puls- freq. pro Min.	Art- ven. Diff.	Herz- minn- tenvol. L.	Resp. Quot.	O <sub>2</sub> -vor- brauch ml pro Min.	Puls- freq. pro Min.	Art- ven. Diff.	Herz- minn- tenvol. L.	Resp. Quot.	O <sub>2</sub> -vor- brauch ml pro Min.	Puls- freq. pro Min.	Art- ven. Diff.	Herz- minn- tenvol. L.	Resp. Quot.
19. 2	200	56	59	3.4	0.77										
26. 2	206	56	62	3.3	0.73	218	53	59	3.7	0.65	224	51	66	3.4	0.69
26. 2	209	60	—	—	0.77	241	68	60	4.0	0.79					
4. 3	212	60	65	3.3	0.75	247	61	63	3.9	0.73	246	62	70	3.5	0.73
4. 3	192	56	51	3.8	0.84	223	70	54	4.2	0.88					
4. 3	198	58	52	3.8	0.82	228	60	55	4.2	0.81	231	57	61	3.8	0.80
	202.8 + 3.06	57.7 ± 0.80	57.8 + 2.74	3.52 ± 0.11	0.78 + 0.017	231.4 ± 5.45	62.4 ± 3.04	58.2 ± 1.65	4.00 + 0.09	0.77 ± 0.039	233.7	56.7	65.7	3.57	0.74

Tabello 2.

Versuche mit subkutaner Injektion von Doryl bei S. B. (25 J., 75 kg) und W. D. (23 J., 75 kg).

Vor- suchs- person	Ver- suchs- tag	Vor der Injektion					10—30 Min. nach der Injektion					40—60 Min. nach der Injektion					Doryl- dosis mg.
		O <sub>2</sub> -Ver- brauch ml pro Min.	Puls- freq. pro Min.	Art.- ven. Diff.	Herz- minn- tenvol. L.	Resp. Quot.	O <sub>2</sub> -Ver- brauch ml pro Min.	Puls- freq. pro Min.	Art.- ven. Diff.	Herz- minn- tenvol. L.	Resp. Quot.	O <sub>2</sub> -Ver- brauch ml pro Min.	Puls- freq. pro Min.	Art.- ven. Diff.	Herz- minn- tenvol. L.	Resp. Quot.	
S. B.	19. 5.	241	64	54	4.5	0.82											
	20. 5.	242	62	57	4.0	0.76	251	—	46	5.4	0.84	271	60	62	4.4	0.72	
		247	64	58	4.3	0.71	239	—	54	4.5	0.77	252	58	61	4.2	0.75	
	Mittel	243.3	63.3	56.3	4.27	0.76	245	—	50	4.95	0.81	261.5	59	61.5	4.30	0.74	
W. D.	5. 7.	251	54	58	4.4	0.75											
		247	54	59	4.2	0.77											
		257	56	62	4.2	0.73	277	64	49	5.7	0.75	249	52	63	4.0	0.78	
		247	56	63	3.9	0.77	275	—	51	5.4	0.79	255	52	66	3.9	0.74	
	Mittel	250.6	55	60.5	4.18	0.76	276	64	50	5.55	0.77	252	52	64.5	3.95	0.74	

im Anschluss an die Injektion eine gewisse Tendenz zur Erhöhung, die später durch Senkung gegenüber der Norm kompensiert wurde. (In dem Versuch vom 19. 2. wurde der sehr niedrige Quotient von 0.65 in der ersten halben Stunde erreicht, zu bemerken ist aber, dass die betreffende Bestimmung ganz am Ende dieser Periode erfolgte, so dass sehr wahrscheinlich der Höhepunkt schon passiert war.)

Es war zu vermuten, dass die geschilderten Wirkungen kräftiger hervortreten würden, wenn die verabreichte Dorylmenge grösser wäre. Dies wird deutlich durch den folgenden Versuch illustriert.

7. 6. 1941. S. B., fastend, sitzt in vollständiger Ruhe seit 9.15.  
 10.12—10.19 O<sub>2</sub>-Verbrauch 236 ml/Min., resp. Quot. 0.72.  
 10.20 Art.-ven. Diff. 59, Herzminutenvolumen 4.0 L.  
 10.30 Pulsfrequenz 66, Blutdruck 110/80, Amplitudenfrequenzprod. 20.9.<sup>1</sup>  
 10.45—10.52 O<sub>2</sub>-Verbrauch 271 ml/Min., resp. Quot. 0.71.  
 10.54 Art.-ven. Diff. 65, Herzminutenvolumen 4.2 L.  
 11.02 Pulsfrequenz 64, Blutdruck 110/86, Amplitudenfrequenzprod. 15.7.  
 11.20 Subkutane Injektion von 0.5 mg Doryl in 2 ml Lösung.  
 11.24—11.31 O<sub>2</sub>-Verbrauch 302 ml/Min., resp. Quot. 0.96.  
 11.26 Pulsfrequenz 88.  
 11.28 Schwitzt.  
 11.32 Art.-ven. Diff. 47, Herzminutenvolumen 6.4 L.  
 11.39 Nausea, Salivation. Pulsfreq. 70, Blutdruck 113/72, Amplitudenfrequenzprod. 31.0.  
 11.42 Leichte Nausea, kräftiges Schwitzen, Extrasystolie, Akkommodationskrampf, Harndrang.  
 11.55—12.04 O<sub>2</sub>-Verbrauch 272 ml/Min., resp. Quot. 0.65.  
 12.05 Art.-ven. Diff. 59, Herzminutenvolumen 4.6 L.  
 12.12 Pulsfrequenz 62, Blutdruck 115/82, Amplitudenfrequenzprodukt 20.8.  
 12.25—12.33 O<sub>2</sub>-Verbrauch 273 ml/Min., resp. Quot. 0.68.  
 12.34 Art.-ven. Diff. 65, Herzminutenvolumen 4.2 L.  
 12.40 Pulsfrequenz 60, Blutdruck 118/85, Amplitudenfrequenzprodukt 19.5.

Der Sauerstoffverbrauch wurde hier um etwa 20 Prozent erhöht, da aber die arterio-venöse Differenz gleichzeitig sank, betrug die Erhöhung des Herzminutenvolumens nicht weniger als 56 Prozent. Noch nach 45 Min. war der Blutstrom etwas (10 Prozent) vergrößert, während der Wert nach 74 Minuten vollkommen normal war. Die starke primäre Zunahme der Pulsfrequenz und die spätere Abnahme unter den Ausgangswert sind gut ersichtlich, ebenso die Senkung des mittleren Blutdruckes auf der Höhe der

<sup>1</sup> Vgl. LILJESTRAND und ZANDER (1928).

Kreislaufwirkung. Illustrativ ist ferner das Verhalten des respiratorischen Quotienten, das 4—11 Min. nach der Injektion den hohen Wert von 0.96 erreichte, um später wesentlich unter den Ausgangswert zu fallen.

Nach peroraler Zufuhr von Doryl ist zu erwarten (vgl. oben!), dass eine grössere Menge gegeben werden muss, sowie dass die Wirkungen später eintreten werden. Es stellte sich heraus, dass es nach 12—16 mg unter diesen Verhältnissen etwa eine halbe Stunde dauerte, ehe subjektive Symptome eintraten. Gleichzeitig fanden wir eine mässige Abnahme des mittleren Blutdruckes. Wir führten deshalb Bestimmungen des Herzminutenvolumens teils 35—45 Minuten nach der Einnahme, teils etwas später aus. Wie aus der Tabelle 3 hervorgeht, bestanden zu dem erstgenannten Zeitpunkte die typischen Wirkungen kräftig entwickelt; nach 46—70 Minuten waren sie noch deutlich. In einem Falle (27. 6) trat die Maximalwirkung auf das Herzminutenvolumen erst in der späteren Probeperiode ein, während in der ersten nur ein unsicherer Effekt vorhanden war.

### Acetyl- $\beta$ -Methylcholin.

Von dem Mecholyl wird angegeben, dass bei Injektion 10—25 mg etwa ebenso kräftig wirken wie 0.25—0.5 mg Doryl (FRASER 1938). Wir injizierten deshalb subkutan bei zwei von unseren Versuchspersonen bzw. 12.5 und 12 mg Mecholyl. Wie aus der Tabelle 4 zu ersehen ist, bekamen wir prinzipiell dieselben Effekte wie nach Doryl. Besonders deutlich traten hier die primäre Pulsbeschleunigung und die gleichzeitige Erhöhung des respiratorischen Quotienten hervor. Der Blutdruck blieb dagegen beinahe unverändert. In der letzten Probeperiode wurde die Pulsfrequenz wieder normal oder etwas niedriger, und die kompensatorische Senkung des Quotienten ist gut ersichtlich. Was den quantitativen Vergleich mit Doryl betrifft, ist die Wirkung von 10—12.5 mg Mecholyl offenbar weit kräftiger als diejenige von 0.25—0.34 mg Doryl. Der Sauerstoffverbrauch ist in den Mecholylversuchen durchschnittlich um 16—20 Prozent gestiegen und das Herzminutenvolumen hat infolge der schlechteren Ausnützung des arteriellen Sauerstoffes um 58; bzw. 47 Prozent zugenommen, was wesentlich mehr ist als in den Dorylversuchen. Ein Vergleich mit dem einzigen Dorylversuch, bei dem 0.5 mg gegeben wurde, spricht eher dafür, dass 10—12.5 mg Mecholyl etwa ebenso wirken



Tabelle 3.

Versuche mit peroraler Zufuhr von Doryl bei S. B.

Versuchs- tag	Vor der Medikation					35—45 Min. nach der Medikation					46—70 Min. nach der Medikation					Doryl- dosis mg
	O <sub>2</sub> -Ver- brauch ml pro Min.	Puls- freq. pro Min.	Art.- ven. Diff.	Herz- minu- tenvol. L.	Resp. Quot.	O <sub>2</sub> -Ver- brauch ml pro Min.	Puls- freq. pro Min.	Art.- ven. Diff.	Herz- minu- tenvol. L.	Resp. Quot.	O <sub>2</sub> -Ver- brauch ml pro Min.	Puls- freq. pro Min.	Art.- ven. Diff.	Herz- minu- tenvol. L.	Resp. Quot.	
17. 6.	235	64	58	4.1	0.73						254	76	55	4.6	0.77	12
„	241	64	68	3.6	0.71						253	60	69	4.3	0.73	
19. 6.	222	64	58	3.9	0.78	288	66	49	5.9	1.02						16
„	219	62	62	3.5	0.76						253	58	54	4.7	0.74	
25. 6.	238	60	56	4.3	0.77	291	76	46	6.4	0.75						14
„	239	62	61	3.9	0.75						244	66	43	5.7	0.84	
27. 6.	240	60	59	4.1	0.78	266	70	61	4.4	0.84						14
„	240	62	63	3.8	0.76						226	64	43	5.3	0.72	
	234.3 + 3.08	62.3 ± 0.52	60.6 ± 1.33	3.90 ± 0.09	0.755 ± 0.009	281.7	70.7	52.0	5.57	0.87	246.0 ± 5.3	61.8 ± 3.14	52.8 ± 4.81	4.92 ± 0.25	0.76 ± 0.02	

Tabelle 4.  
Versuche mit subkutaner Injektion von Mecholyl.

Ver- suchs- person	Ver- suchs- tag	Vor der Injektion					10—30 Min. nach der Injektion					40—60 Min. nach der Injektion					Mecholyl- dosis mg
		O <sub>2</sub> -Ver- brauch ml pro Min.	Puls- freq. pro Min.	Art.- ven. Diff.	Horz- minn- tenvol. L.	Resp. Quot.	O <sub>2</sub> -Ver- brauch ml pro Min.	Puls- freq. pro Min.	Art.- ven. Diff.	Horz- minn- tenvol. L.	Resp. Quot.	O <sub>2</sub> -Ver- brauch ml pro Min.	Puls- freq. pro Min.	Art.- ven. Diff.	Horz- minn- tenvol. L.	Resp. Quot.	
S. B.	9. 6.	244	68	61	4.0	0.77											
"	"	237	67	66	3.6	0.77	286	120	42	6.8	0.90	257	66	62	4.2	0.64	12.5
"	11. 6.	255	66	64	4.0	0.80											
"	"	253	65	59	4.3	0.81	279	112	41	6.7	0.92	254	65	63	4.1	0.79	12.5
"	13. 6.	248	65	58	4.3	0.82											
"	"	236	62	61	3.9	0.82	286	96	51	5.6	0.96	250	62	73	3.4	0.73	
												244	58	74	3.3	0.75	12.5
	Mittel	245.5 ±3.35	65 ±0.84	61.5 ±1.24	4.02 ±0.11	0.798 ±0.009	283.7	109.3	44.7	6.37	0.927	251.3 ±2.81	62.8 ±1.80	67.8 ±3.34	3.76 ±0.23	0.728 ±0.032	
W. D.	10. 7.	246	56	57	4.3	0.79	293	92	47	6.2	0.87	254	56	62	4.1	0.76	10
"	12. 7.	238	54	63	3.8	0.78											
"	"	221	56	60	3.7	0.72	274	70	51	5.4	0.87	278	52	69	4.0	0.73	10
	Mittel	235	55.3	60.0	3.93	0.763	283.5	81	49	5.80	0.87	266	54	65.5	4.05	0.745	

wie 0.5 mg Doryl. In der Tat war der Effekt der Mecholyldose so stark, dass die Erscheinungen mit dem raschen, zum Teil auch sehr unregelmässigen Puls, bisweilen etwas alarmierend waren.

### Diskussion.

Die von uns gefundene Erhöhung des Stoffwechsels stimmt mit den in der Einleitung erwähnten Beobachtungen von ELLIS und WEISS sowie von STARR. Die Zunahme ist in unseren Fällen etwas grösser, hält sich aber in mässiger Höhe. Dass sie nach Mecholyl etwas stärker ausfällt als nach Doryl, ist wohl darauf zurückzuführen, dass die Mecholyldosen überhaupt relativ wirksamer waren.

Eine Erhöhung des respiratorischen Quotienten wurde besonders in Fällen mit starker Kreislaufwirkung beobachtet. Sie ist nach subkutaner Zufuhr von 0.25—0.34 mg Doryl nur angedeutet, deutlich nach 0.5 mg subkutan, bzw. nach den relativ grossen Dosen peroral und besonders ausgeprägt nach Mecholyl. Diese Erhöhung ist ein Ausdruck der bekannten atmungsstimulierenden Wirkung. Wenn diese zurückgeht, findet man die gewöhnliche kompensatorische Abnahme des Quotienten, wie sie auch in anderen Fällen, z. B. nach heftiger Spontanatmung oder nach Aufhören einer Hypoxämie beobachtet wird. Was die Ursache der verstärkten Atmung betrifft, dürfte vor Allem mit direkter Reizwirkung der Cholinverbindungen an den Chemorezeptoren des Glomus caroticum zu rechnen sein (HEYMANS, BOUCKAERT, FARBER und HSU 1936, vgl. v. EULER, LILJESTRAND und ZOTTERMAN 1940). Daneben kann vielleicht auch eine durch Blutdrucksenkung bedingte Hypoxämie eine Rolle spielen (vgl. v. EULER und LILJESTRAND 1937).

Unsere Versuche zeigen deutlich, dass eine mässige Zunahme des Herzminutenvolumens nach den geprüften Doryl-, bzw. Mecholyldosen eingetreten ist. Wie oben angedeutet, ist dies in bester Übereinstimmung mit den theoretischen Erwartungen. Die Zunahme ist nicht gross, und es ist deshalb nötig, eine empfindliche und zuverlässige Methodik zu benutzen. Wir meinen, dass dies in früheren Untersuchungen nicht genügend berücksichtigt wurde.

Besondere Aufmerksamkeit hat man der primären Erhöhung der Pulsfrequenz nach Doryl oder Mecholyl gewidmet. Der parasympathikomimetischen Wirkung nach wäre eine Pulsverlang-

samung zu erwarten, die ja auch später eintritt. Man hat verschiedene Erklärungsmöglichkeiten angedeutet. FRASER und ebenso STARR, ELSOM und REISINGER meinen, dass die erhöhte Pulzfrequenz durch den niedrigen Blutdruck über Sinus caroticus ausgelöst wird. Die Beobachtungen von MEYERSON, LOMAN und DAMESHEK (1937) beweisen aber, dass dies keine genügende Erklärung gibt, denn die Pulsfrequenzzunahme kann bei sehr unbedeutender Blutdrucksenkung eintreten. Wir möchten hervorheben, dass die Zunahme des Herzminutenvolumens an und für sich zu einer Pulsbeschleunigung führen muss, die nicht vollständig durch die parasymphatikomimetische Wirkung kompensiert zu werden braucht. Ganz analoge Verhältnisse fanden BLOMBERG und RÖNNELL (1930) nach Pilocarpin.

### Zusammenfassung.

Bei drei Versuchspersonen wurde eine mässige Zunahme des Herzminutenvolumens nach Zufuhr von Doryl beobachtet. Bei zwei Versuchspersonen ergab auch Mecholyl Vergrösserung des Herzminutenvolumens.

Sowohl Doryl wie Mecholyl führten zu einer Erregung der Atmung, die sich in einer primären Zunahme und sekundären Abnahme des respiratorischen Quotienten zeigte.

### Literaturverzeichnis.

- BLOMBERG, A., und S. RÖNNELL: Arch. int. Pharmacodyn. 1930. 37. 369.  
 CARMICHAEL, A. E., und F. R. FRASER, Heart 1933. 16. 263.  
 ELLIS, L. E., und S. WEISS: J. Pharmacol. a. exp. Therap. 1932. 44. 235.  
 v. EULER, U. S., und G. LILJESTRAND: Skand. Arch. Physiol. 1929. 55. 1.  
 —, und G. LILJESTRAND: Ebenda 1937. 77. 191.  
 —, G. LILJESTRAND und Y. ZOTTERMAN: Acta physiol. scand. 1940. 1. 383.  
 FRASER, F. R.: Brit. med. J. 1938. 1. 1293.  
 GROLLMAN, A.: The cardiac Output of Man in Health and Disease, London 1932.  
 GAISBÖCK, F., und A. JARISCH: Wien. klin. Wschr. 1927. 40. 1540.  
 HEYMANS, C., J. J. BOUCKAERT, S. FARBER und F. J. HSU: Arch. int. Pharmacodyn. 1936. 54. 129.

- LILJESTRAND, G., und G. NYLIN: Acta physiol. scand. 1940 a. *1*. 238.  
—, und G. NYLIN: Schweiz. med. Wschr. 1940 b. *71*. 275.  
—, und E. ZANDER: Z. ges. exp. Med. 1928. *59*. 105.  
LINDHARD, J.: Arch. ges. Physiol. 1915. *161*. 233.  
MEYERSON, A., J. LOMAN und W. DAMESHEK: Amer. J. Med. Sc. 1937. *193*. 198.  
STARR, I.: Amer. J. Med. Sc. 1937. *193*. 393.  
—, K. A. ELSOM und J. A. REISINGER: Amer. J. Med. Sc. 1933. *186*. 313.  
—, und L. K. FERGUSON: Amer. J. med. Sc. 1940. *200*. 372.  
—, C. J. GAMBLE, A. MARGOLIES, J. S. DONAL, N. JOSEPH und E. EAGLE: J. clin. Invest. 1937. *16*. 799.  
WEISS, S., und L. B. ELLIS: J. Pharmacol. a. exp. Therap. 1934. *52*. 113.
-

From the Institute of Theoretical Physics, University of Copenhagen.

## Potassium Interchange in the Human Body.

By

G. HEVESY.

(Received 12 September 1941.)

---

Interchange between the potassium present in the cells and the potassium present in the extracellular fluid of animals can be determined by using radiopotassium ( $^{42}\text{K}$ ) as an indicator. Two methods were applied. One method is based on the comparison of the  $^{42}\text{K}$  content of the plasma (extracellular) potassium and the  $^{42}\text{K}$  content of the tissue potassium. (HAHN et alia 1939, 1941; FENN et alia 1941. Comp. also JOSEPH et alia 1939.)

The other method (HAHN et alia 1939, 1941) is based on the measurement of the amount of labelled potassium which disappeared in the course of the experiment from the plasma. Since the amount of potassium present in the tissue cells is many times larger than the amount of potassium present in the extracellular space, a rapid interchange between plasma (extracellular) potassium and cellular potassium will soon lead to a strong depletion of the plasma  $^{42}\text{K}$  content. The rate of disappearance of  $^{42}\text{K}$  from the plasma (extracellular space) is, therefore, a very sensitive measure of the rate of interaction between plasma (extracellular) potassium and cellular potassium. This method has the disadvantage that assumptions have to be made concerning the potassium content of the tissue cells. The advantage of the method is its great simplicity. It suffices to analyse the plasma or, as we shall see below, the urine. In experiments on human subjects clearly the last mentioned alone can be applied.

## Experimental Procedure.

The labelled potassium was prepared by bombarding 80 mgm. KCl with a deuterium beam in the Copenhagen cyclotron. The activity obtained was 1/500 milliCurie. We are much indebted to Professor J. C. JACOBSEN and Mr. O. N. LASSEN for preparing the radiopotassium. The sample obtained was dissolved in 20 cc. water and was taken 5 hours after the last meal by mouth by a male subject weighing 70 kg. Urine samples were collected at intervals, and the activity of the samples was determined.

As the ratio of  $\frac{^{42}\text{K}}{\text{total potassium}}$  can be assumed to be about the same in the plasma and the urine, the determination of the activity of the urine potassium informs us on the  $^{42}\text{K}$  content of the plasma potassium at the time of the formation of the urine.

The urine samples were ashed below  $400^\circ$  and their activity was compared with the activity of a standard preparation. This was prepared by adding an aliquot part of the solution of labelled potassium chloride taken by mouth to non-active urine. The ash samples weighed about 300 mgm. They were placed under the Geiger counter in aluminium dishes of 1.2 cm diameter. The potassium content of the samples was kindly determined by Dr. L. HAHN using SOHL and BENNET's method.

We shall first consider the case that, in the course of the experiment, no interchange takes place between the extracellular and the cellular potassium. Then the total  $^{42}\text{K}$  absorbed from the intestine should be present in the extracellular fluid of the body except for the  $^{42}\text{K}$  excreted and the amount taken up by the corpuscles. The amount of labelled potassium excreted in the course of 24 hours was found to make out about 7 per cent of the amount present in the body, while as found in the case of the rabbit and the rat the corpuscles can be assumed to contain about as much  $^{42}\text{K}$  as is present in the extracellular fluid. Assuming the potassium content of the plasma to be 20 mgm. per cent (WECHSELBAUM et alia 1940) and the extracellular space to make out 19 litres (BRÖDIE et alia 1939; KALTREIDER et alia 1940) in a human subject weighing 70 kg., the extracellular fluid can be estimated to contain 3,800 mgm. potassium. Since about  $1/2$  of the  $^{42}\text{K}$  administered should in the above case be present in the corpuscles 1 mgm. plasma (extracellular) potassium will contain

about  $\frac{46 \cdot 5}{3800} = 0.012$  per cent of the amount of  $^{42}\text{K}$  administered.

Let us now consider the other extreme case, viz. full interchange in the course of 24 hours between extracellular and cellular potassium. To estimate the percentage of  $^{42}\text{K}$  administered which will be present in 1 mgm. plasma (urine) potassium we have to estimate the potassium content of the tissue of the human subject in question. The major part of tissue potassium is found in the muscles. The average potassium content of human muscles is stated (CUMING 1939; MANGUS and MYERS 1940) to be 330 mgm. per 100 gm. fresh weight. The weight of the muscles was estimated, following a suggestion of Dr. BRANDT REHBERG, from the amount of creatinine excreted through the kidneys in the course of 24 hours. Dr. REHBERG most kindly determined the creatinine content of the urine and found a daily excretion of 1,300 mgm. Prior to these determinations the subject was kept on a vegetarian diet. In the determination of the weight of the muscles from the daily creatinine excretion it is assumed that the creatinine excreted has been formed in the body from creatine and the daily conversion of creatine to creatinine amounts to about 1.32 per cent of the weight of the creatine. From these figures the creatine content of the body can be estimated to be 99 gm. Assuming the creatine of the body to be located in the muscles and the creatine content of the muscles to amount to 0.39 per cent of the weight of the muscles we arrive at the result that the weight of the muscles amounts to 25 kg. and that, correspondingly, the muscles contain about 82 gm. potassium.

About  $\frac{3}{4}$  of the potassium content of the mammalian body is found in the muscles. Assuming this to be the case in the human body, we arrive at the estimate that the body of the human subject in question contains 110 gm. potassium of which 106 gm. are located in the cells. The amount of extracellular potassium of the body is thus 3.6 per cent of the total potassium content of the organism. In the case of total interchange between extracellular and cellular potassium, only 3.6 per cent of the amount of labelled potassium absorbed into the circulation minus the  $^{42}\text{K}$  excreted<sup>1</sup> should be present in the extracellular space. In the case of total interchange, 1 mg. urine potassium should thus after the lapse of 48 hours only contain 0.0010 per cent of the labelled potassium administered.

---

<sup>1</sup> We found the excretion of  $^{42}\text{K}$  through the bowels to make out roughly 15 per cent of the amount excreted through the kidneys, the total excretion of  $^{42}\text{K}$  in the course of the experiment being about  $11 + 0.15 \times 11 = 13$  per cent.



## Results.

In the first experiment, the results of which are seen in Table 1, urine was collected during the first 2 days after drinking the solution containing the labelled potassium chloride. The presence of easily demonstrable amounts of  $^{42}\text{K}$  could be shown as early as 12 minutes after drinking the active solution, while a negative result was obtained after the lapse of 5 minutes. The total urine was found to contain 10.5 per cent of the  $^{42}\text{K}$  administered, the potassium content amounting to 3.4 gm. Thus, 1 mgm. average potassium present in the urine contained 0.003 per cent of the  $^{42}\text{K}$  administered. This is much less than the amount which was to be expected (0.012) assuming an absence of interaction between cellular and extracellular potassium (see p. 124).

Table 1.

*Excretion of labelled potassium administered by mouth.*

Time	Percentage of $^{42}\text{K}$ recovered in the urine
12 min.	0.0058
30 "	0.048
3 hours	0.46
5 $\frac{1}{4}$ "	0.65
16 $\frac{1}{4}$ "	4.75
40 $\frac{1}{2}$ "	3.00
48 $\frac{1}{4}$ "	1.56
	Total 10.47
	Volume of urine = 2,041 cc.

The results of this preliminary experiment lead thus to the conclusion that a very substantial part of the  $^{42}\text{K}$  absorbed into the circulation must have found its way into the tissue cells while substantially equal number of nonlabelled potassium atoms migrated from the cells into the extracellular space.

In the two following experiments, besides determining the percentage of  $^{42}\text{K}$  administered which was excreted in the course of 65 $\frac{1}{2}$  hours and the potassium content of the urine, urine samples were collected on three consecutive days between 9 and 11 $\frac{1}{2}$  hours and their activity and potassium content were determined. The results of these experiments are seen in Tables 2 and 3.

Table 2.  
 $^{42}\text{K}$  content of urine samples.

Samples collected between (reckoned from the start of the experiment)	Potassium content per cc. urine in mgm.	Percentage of $^{42}\text{K}$ administered present in 1 mgm. urine potassium	
		Found	Calculated assuming total interchange
15 and 17½ hours . . . .	3.77	0.0014	0.0010
39 and 41½ hours . . . .	3.85	0.0011	0.0010
63 and 65½ hours . . . .	3.05	0.0014	0.0010
0 and 65½ hours	1.75	0.0024	
Total urine volume = 2,990 cc.			
Percentage of the $^{42}\text{K}$ administered present in the total urine = 12.7 per cent.			

Table 3.

Samples collected between (reckoned from the start of the experiment)	Potassium content per cc. urine in mgm.	Percentage of $^{42}\text{K}$ administered present in 1 mgm. urine potassium	
		Found	Calculated
15 and 17½ hours . . . .	2.24	0.0015	0.0010
39 and 41½ hours . . . .	2.70	0.0011	0.0010
63 and 65½ hours . . . .	2.30	0.0013	0.0010
0 and 65½ hours	1.26	0.0025	0.001
Total urine volume = 2,880 cc.			
Percentage of the $^{42}\text{K}$ administered present in the total urine = 9.1 per cent.			

While no pronounced difference in the specific activity of the potassium collected after 15, 39 and 63 hours is observed, in the early phases of the experiment potassium of higher specific activity was excreted than in the later phases. This follows from the higher value found for the specific activity of the average potassium present in the urine collected.

1 cc. urine collected between 9 a. m. and 11½ a. m. was found to have an appreciably higher potassium content than 1 cc. of average urine. This result is in accordance with the general experience according to which urine collected between the early hours of the day and noon has the highest potassium concentration.

## Discussion.

While the accuracy of the method applied does not suffice to determine whether a full interchange between the potassium of the cells and the potassium of the extracellular fluid took place the results obtained clearly indicate (see the 2 last columns of Tables 2 and 3) that the greatest part of the labelled potassium ions and, thus, the greatest part of all potassium ions taken with the food find their way within 16 hours or less into the tissue cells while potassium ions formerly located in the cells move simultaneously into the extracellular fluid. In the average urine sample collected during the experiment, the potassium was found to be markedly less active than in the samples collected after the lapse of 15 hours. This is due to a higher activity of the potassium excreted in the first phase of the experiment. This result indicates that the interchange between cellular and extracellular potassium is not a very rapid process since it takes several hours before a large part of the extracellular potassium interchanges with the potassium of the cells.

## Apparent Volume of Distribution.

In connection with the experiments reported in this note it is of interest to recall experiments carried out by BOURDILLON (1937) in which the apparent volume of distribution of potassium chloride taken by him by mouth was investigated. The apparent volume of distribution =

$$\frac{\text{amount absorbed into the circulation minus amount excreted}}{\text{increase in concentration in serum water}}$$

If the potassium taken by mouth would remain in the extracellular fluid, the apparent volume of distribution should be 25 to 30 per cent of the body weight. BOURDILLON found, in experiments on himself, an apparent volume of exogenous potassium corresponding to 75 per cent of the body weight and a similar result was obtained in experiments on dogs by WINKLER and SMITH (1938) and on cats by FENN (1939). The apparent volume of distribution of the labelled potassium taken by mouth in the experiments described in this note can be computed to be about 400 litres or 570 per cent of the body weight.

The striking difference in the results of BOURDILLON and the results arrived at in this note illustrates the great difference between accumulation and interchange of potassium. In BOURDILLON's experiment, additional potassium had to accumulate in some or all tissue cells and, if we assume the concentration of the extracellular fluid to remain isotonic, such an accumulation necessitates the exodus of other cations from the cells. This can only take place on a very restricted scale. Not so the interchange of extracellular potassium with cellular potassium. No other elements have to leave the cells to make place for the labelled potassium, it suffices that non-labelled potassium atoms makes place for labelled ones.

### Excretion of Sodium.

The sodium content of the extracellular fluid is about 15 times larger than its potassium content. Since the potassium content of the urine does not much differ from its sodium content we should expect a much larger part of the potassium present at any moment in the extracellular space to be excreted through the kidneys in the course of the first 24 hours, for example, than of the sodium simultaneously present in the extracellular fluid. Thus in the urine, a much larger part of  $^{42}\text{K}$  administered than of  $^{24}\text{Na}$  administered should be present. This is, however, not the case. As seen in Table 4, the percentage of daily excreted

Table 4.

*Excretion of  $^{24}\text{Na}$  administered through the kidneys.*

Urine sample secured after	Volume in cc.	Percentage of the $^{24}\text{Na}$ administered present in the urine sample
10 min. . . . .	5	0.00046
20 min. . . . .	2.9	0.0076
46 min. . . . .	3.9	0.036
98 min. . . . .	10	0.056
6 hours . . . . .	80	0.31
19 hours . . . . .	590	2.86
43 hours . . . . .	1,700	4.75
67 hours . . . . .	1,440	4.5
Total	3,832	12.5

$^{24}\text{Na}$  does not much differ from the percentage of daily excreted  $^{42}\text{K}$ . From this result it follows that most potassium ions present in the urine are such which were previously located in the cellular and not in the extracellular fluid; a conclusion which is in accordance with the result arrived at in the previous section.

### Results.

Labelled potassium chloride was administered to a human subject and the potassium and the  $^{42}\text{K}$  content of the urine samples collected within 65 hours were determined. After the lapse of 15 minutes,  $5 \cdot 10^{-5}$  part of the  $^{42}\text{K}$  administered was found to be present in the urine. In the course of 48 hours, about 11 per cent were excreted through the kidneys.

Making the assumption that the  $^{42}\text{K}$  content of 1 mgm. potassium present in the urine is about the same as the  $^{42}\text{K}$  content of 1 mgm. potassium present in the plasma (extracellular space), from the  $^{42}\text{K}$  content of the urine potassium the  $^{42}\text{K}$  content of the extracellular fluid of the body can be computed. By this method, it was found that a very large part of the  $^{42}\text{K}$  absorbed into the circulation found its way into the tissue cells in the course of 16 hours or less.

While the accuracy of the method does not suffice to determine whether a full interchange between the potassium of the cells and the potassium of the extracellular fluid took place in the course of the experiment, it is clearly shown that a very substantial part of the labelled potassium and thus of all potassium taken with the food interchanges with the potassium located in the tissue cells in the course of some hours.

Labelled sodium was found to leave the body at a similar rate as labelled potassium.

Best thanks are due Dr. BRANDT REHBERG for valuable suggestions in connection with this investigation.

### References.

- BOURDILLON, J.: Amer. J. Physiol. 1937. 120. 411.  
BRODIE, B. B., E. BRAND and S. LESHIN: J. Biol. Chem. 1939. 133. 555.  
CUMING, I. N.: Biochem. J. 1939. 33. 642.  
FENN, W. O.: Amer. J. Physiol. 1939. 127. 356.

- HAHN, L., G. HEVESY and O. REBBE: *Biochem. J.* 1939. *33*. 1540.  
HEVESY, G. and L. HAHN: *Kgl. Dansk Vidensk. Selsk. Medd.* 1941. XVI. 1.  
JOSEPH, M., E. COHN, and D. M. GREENBERG: *J. Biol. Chem.* 1939. *33*. 1540.  
KALTREIDER, N. L., G. M. MENEELY, I. R. ALLEN, S. N. VAN VOORHIS and V. F. DOWNING: *J. clin. Invest.* 1940. *19*. 769.  
MANGUS, G. H. and V. C. MYERS: *J. biol. Chem.* 1940. *135*. 411.  
NOONAN, T. R., W. O. FENN and L. HAEGE: *Amer. J. Physiol.* 1941. *132*. 444.  
WECHSELBAUM, T., M. SOMOGYI and H. RUSK: *J. biol. Chem.* 1940. *132*. 343.  
WINKLER, A. W., and P. K. SMITH: *J. biol. Chem.* 1938. *124*. 589.
-

## The Negative Component $P_{III}$ in the Retinogram of the Tortoise.

By

CARL GUSTAF BERNHARD.

(Received 20 September 1941.)

The analysis of the retinal response of the vertebrate eye has led to a subdivision of this composite potential into three component processes  $P_I$ ,  $P_{II}$ , and  $P_{III}$  (see a monograph by GRANIT, 1938). Electroretinograms of cats (GRANIT, 1933, CREED and GRANIT, 1933), frogs (GRANIT and RIDDELL, 1934, THERMAN, 1938), owls, pigeons (GRANIT, 1935), and rats (CHARPENTIER, 1936), demonstrate the properties of these components.

Now I have found the retinogram of the tortoise's (*Testudo graeca*) practically pure cone-eye to be dominated by the negative component  $P_{III}$  more than the electrical response of any other eye. In fact, it reminds one of the type of negative electroretinogram obtained in the frog's eye after massage (WALLER, 1909, GRANIT and RIDDELL, 1934) or treatment with KCl (THERMAN, 1938) or low temperature (NIKIFOROWSKY, 1912). As hitherto largely negative electroretinograms only have been obtained by diverse methods of interfering with the normal functional state of the eye, and the negative component  $P_{III}$  thus may have been influenced by such procedures, it is of interest to subject the normally by  $P_{II}$  dominated retinogram of the tortoise to treatment designed to illustrate properties ascribed to  $P_{III}$ .

There is no particular reason to assume that eyes of tortoises as such could not stand isolation. At any rate the isolated and opened eyes of tortoises discharge impulses in response to illumination in experiments with micro-electrodes (GRANIT, 1941),

provided that they give an electroretinogram with remnant  $P_{II}$  present in the negative  $P_{III}$ . In this respect they behave as other eyes. But it is possible that incipient winter-sleep was responsible for the dominance of the negative component. The eyes definitely became much less excitable as autumn advanced towards winter.

This suggestion is supported by the fact that the eyes did not last as well as frogs' eyes. Even though for serial observations only those retinae were used which from the beginning gave large and constant deflections to the standard illumination with "white" light (from a 100 W bulb), it was deemed necessary not to extend the observations over 10 minutes. Successful experiments were carried out with some 15 tortoises all of which had been in weak daylight before decapitation. Our standard 3-stage push-pull directly coupled amplifier in conjunction with a cathode ray was used for recording.

The polyphasic retinogram of the isolated eye varies somewhat in shape from case to case, but the principal features of these variations fall within the limits shown by the records marked A in figg. 1—3. The initial a-wave is well marked in all records, and in 2A passes on into a large negative  $P_{III}$  interrupted by a small b-wave. In 1A the b-wave is insignificant and outbalanced by the a-wave. The b-wave is best marked in 3A. The off-effect or d-wave is clearly seen in all records.

Retinograms such as 1A, and 3A are found in eyes of frogs when  $P_{II}$  has been diminished or slowed down by various methods. This suggests that the normal electroretinogram of the tortoise's eye differs from that of the frog's eye by having a less active component  $P_{II}$  and an equally large or larger  $P_{III}$ .

Recently BERNHARD and SKOGLUND (1940) have shown that alcohol in moderate doses selectively diminishes the negative  $P_{III}$ . In order to test this effect on the tortoise it is clearly best to use an eye with an electroretinogram of type 2A with a large negative deflection. A drop of alcohol into the eye that gave 2A had the typical effect shown in 2B to the right of it. The large negative component has almost disappeared. The a-wave which marks its beginning is very small and the whole response largely positive as in the frog's eye. These changes are in every detail in complete accordance with the assumptions made.

THERMAN (1938) has demonstrated that potassium most effectively removes the positive component  $P_{II}$  in the frog's eye so that the electroretinogram becomes dominated by the negative  $P_{III}$ .



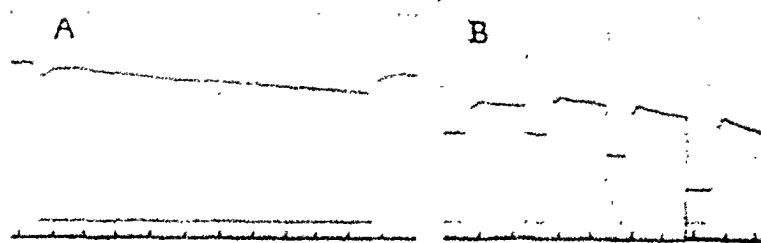


Fig. 1

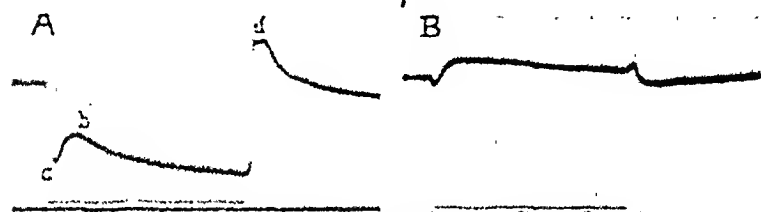


Fig. 2

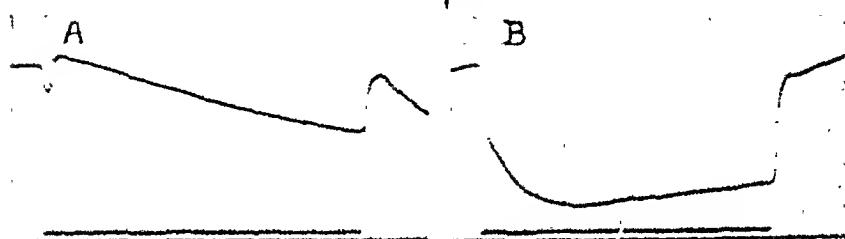


Fig. 3

Fig. 1. Electrorretinogram of the tortoise. A, 10 sec. illumination B, off-effect after respectively 20, 30, 60, and 120 sec. illumination. — Fig. 2. A, normal electrorretinogram. B, after treatment with a drop of 10 % alcohol. — Fig. 3. A, normal electrorretinogram. B, after treatment with a drop of 0.5 % KCl. Time in sec. (Fig. 1) and  $\frac{1}{2}$  sec.

In order to test this effect on the tortoise's eye it is advantageous to use a response of type 3A. 3B to the right of it shows how a drop of 0.5 % KCl into the eye that gave 3A eliminates the positive component leaving a practically pure negative PIII just as it would have done in the frog's eye. The responses in this case are probably somewhat modified by baseline drift.

Another property of the negative component after potassium is that it slowly drops during long exposures, and that the larger the negativity brought about by these means, the greater the swing-back at «off». Fig. 4 schematically illustrates an experiment of this kind in the untreated eye of the tortoise in which the baseline has been carefully checked up for drift. The records of fig. 1B

show a set of readings from such an experiment. For similar records in eyes of frogs after potassium see THERMAN (1938).

In the mixed eye of the frog the negative component diminishes during dark-adaptation (GRANIT and RIDDELL, 1934, BERNHARD and SKOGLUND, 1940) when rod vision comes to the fore. In the practically pure cone-eye of the tortoise there is no difference in the electroretinogram between the two states of adaptation.

The dark-adapted frog's eye has a well marked slow rising component  $P_I$ , responsible for the so-called e-wave or secondary rise. A secondary rise has never been seen in the tortoise's eye which in this respects behaves as the light-adapted frog's eye.

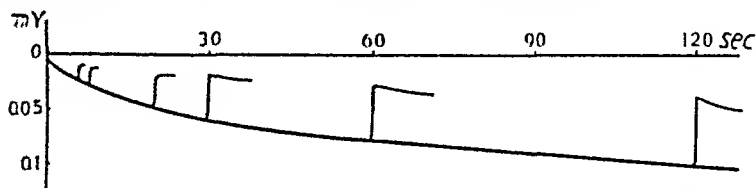


Fig. 4. Diagram showing the increasing negativity of the electroretinogram during prolonged exposure. The swing-back at cessation of illumination inserted for different exposures.

### Comment.

There can be little doubt but that the retinogram of the tortoise, despite its somewhat abnormal shape in a normal eye, is made up of the elementary component potentials which have been recognized in other eyes. Is the reason for the dominance of the negative component that cone-eyes have such properties, that is, either larger negative  $P_{III}$  or smaller and slower positive  $P_{II}$ ? Actually this conclusion is suggested by other evidence. Thus MESERVEY and CHAFFEE (1927) and CHAFFEE and SUTCLIFFE (1930) report that the negative phases are more prominent in the cone-eye of the horned toad. The same authors also point out that e-waves are absent in cold-blooded cone-eyes. The small positive  $P_{II}$  and the large negative  $P_{III}$  probably therefore are due to the absence of rods, even though incipient winter-sleep may have emphasized this state of affairs.

### Summary.

Retinal action potentials have been recorded from isolated eyes of the Greek tortoise (*Testudo graeca*) with the aid of a directly coupled amplifier and a cathode ray oscillograph.

The eye of the tortoise, studied in the autumn, responds to light with an electroretinogram containing the components P<sub>II</sub> and P<sub>III</sub> but dominated by the negative P<sub>III</sub>. Potassium eliminates the positive, and alcohol the negative component thus serving to identify them and to homologize them with components of other types of eyes in which normally the positive P<sub>II</sub> dominates.

The electroretinogram of the tortoise's practically pure cone-eye does not change its shape with changes in state of adaptation. A positive component P<sub>I</sub> has not been observed in the tortoise's eye.

In the discussion it is suggested that the electroretinogram of the tortoise, to some extent at least, derives its unusual shape from the fact that this animal has a cone-eye.

#### References.

- BERNHARD, C. G.: *Acta Physiol. Scand.* 1940. *1.* suppl. 1.  
—, and C. R. SKOGLUND: *Ibidem.* 1941. *2.* 10.  
CHAFFEE, E. L., and E. SUTCLIFFE: *Amer. J. Physiol.* 1930. *95.* 250.  
CHARPENTIER, G.: *Acta Ophthal. Kbh.* 1936. suppl. 1.  
CREED, R. S., and R. GRANIT: *J. Physiol.* 1933. *78.* 419.  
GRANIT, R.: *Ibidem.* 1933. *77.* 207.  
—, *Ibidem.* 1935. *85.* 421.  
—, *Documenta Ophthal.* 1938. *1.* 7.  
—, *Acta Physiol. Scand.* 1941. *1.* 370.  
—, and H. A. RIDDELL: *J. Physiol.* 1934. *81.* 1.  
MESERVEY, A. B., and E. L. CHAFFEE: *J. Opt. Soc. Amer.* 1927. *15.* 311.  
NIKIFOROWSKY, P. M.: *Z. Biol.* 1912. *57.* 397.  
THERMAN, P. O.: *Acta Soc. Sci. Fenn. Nova Ser. B.* 1938. Tom II Nr. 1.  
WALLER, A. D.: *Quart. J. exp. Physiol.* 1909. *2.* 169.
-

From The Neurophysiological Laboratory, The Caroline Institute,  
Stockholm.

## Colour Receptors of the Frog's Retina.

By

RAGNAR GRANIT.

(Received 26 September 1941.)

---

A preliminary account, dealing chiefly with the technique of micro-recording from the retina and of controlling the energy of the spectrum, but also presenting a number of typical curves for the spectral distribution of sensitivity of single or a restricted number of elements in the frog's retina was published in 1939 by GRANIT and SVAETICHIN. In their work it was proved that THOMAS YOUNG was right in his main idea that different elements had different colour sensitivity. Since that time work on the frog's retina has been regularly continued in parallel with work on other eyes in order to collect a very large material of observations permitting us to describe colour reception of the frog's eye with some pretense to completeness. A large number of observations has been necessary because the better the isolation with micro-electrode the more likely that common types of colour sensitive elements have been selected at the expense of rare ones.

Clearly it is impossible to explore every type of eye with the same degree of completeness, except in the course of years of research. I have therefore chosen to give an account of the typical sensitivity-bands for some types of retinae (GRANIT, 1941 a—d) and selected the frog's eye for a more exhaustive study of the problem. For this choice it has been of some significance that the retina of the frog has properties strongly reminiscent of the human periphery. Thus, the Purkinje-shift, first described for this eye by HIMSTEDT and NAGEL (1901), corresponds to that of the human eye, as demonstrated quantitatively by GRANIT and WREDE (1937) with the aid of the electroretinogram;

the visual purples seem to be identical in these two types of eye as are also their scotopic spectra (CHAFFEE and HAMPSON, 1924, GRANIT and MUNSTERHJELM, 1937, GRANIT, 1937). A difference seems to be the greater sensitivity of the frog's eye to blue light, discussed in the papers mentioned by the author and his collaborators.

An experimental material describing colour receptors can, of course, never be complete. But, having now analyzed well over 100 retinæ, I have come to the stage when the experiments never bring anything new or unexpected. This is the reason for my attempt to summarize the observations.

### Methods.

The necessary equipment has consisted of a spectrum, controlled with respect to energy, a graded and calibrated wedge for varying the intensity of the stimulus, micro-electrode, amplifier, cathode ray, and loudspeaker (see GRANIT and SVAETICHEN, 1939). The same unit has been used in a number of experiments with other types of eyes (GRANIT, 1941 a—d). An improvement of the technique since 1939 has been the use of an amplifier for the loudspeaker stage which is worked at the bend of the characteristic of the valve so that only spikes above a certain height become audible and base-line noise is removed. The whole retina has been illuminated with light from the monochromator. Before the experiment the frogs have been light-adapted in our standard light-adapting apparatus (ZEWI, 1939).

The principle of the experiments has been to listen to the discharge, which at the same time is seen on the screen of the cathode ray, and thus to determine the amount of energy necessary for the threshold or for another constant index such as cessation of "flicker". The results are given in terms of the inverse value of this amount of energy in the different wave-lengths, generally in per cent of the maximum.

### Results.

#### 1. Some General Observations.

Sometimes the micro-electrode isolates an element with the same degree of precision, as in HARTLINE's (1938) work on single fibres in the optic nerve, as seen for instance in fig. 1. Sometimes the discharge consists of a number of elements. When to all appearance a single element is active it is impossible to exclude the possibility that the unitary character of the response is due to synchronization. On the other hand, it is likely that

the better the isolation, the greater the probability that the type of element isolated belongs to the most common ones. For this reason it is necessary not to rely merely on experiments with isolated elements. Strict adherence to this criterion may, for instance, lead to the conclusion that blue elements are exceedingly rare whereas often the influence of the blue-sensitive substance can be traced in a less restricted type of response.

Most interesting is to follow how a discharge disappears below and rises above the threshold when the intensity of the stimulus is altered. Relatively rarely one finds, with decreasing intensity, the frequency of the spikes to diminish in such a fashion as to end with one or two spikes just above the threshold. A case of this type is shown in fig. 1. Common, however, is the grouped type of discharge, shown in figs. 2 and 6, which in response to variations in the intensity of the stimulus falls below and rises above the threshold as a grouped unit. Often the spikes of such a group are of different type. It

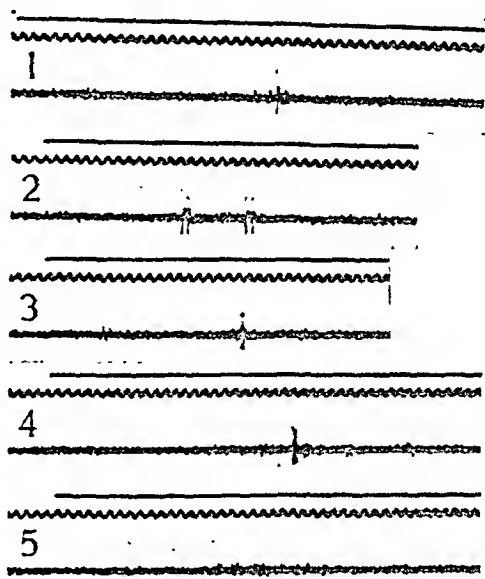


Fig. 1. Isolated spikes from frog's eye in response to different wave-lengths. Light signal and time in  $1/50$  sec. above each record. From above downwards: 1, threshold at  $0.600 \mu$ ; 2, well above threshold at  $0.540 \mu$ ; 3, near threshold at same wave-length; 4, near threshold at  $0.520 \mu$ ; 5, just below threshold at same wave-length, differing by  $5 \text{ nm.}$  on wedge from record 4. In this and most experiments the size of the spikes gradually diminishes in course of experiment. Note the long latent period at threshold.

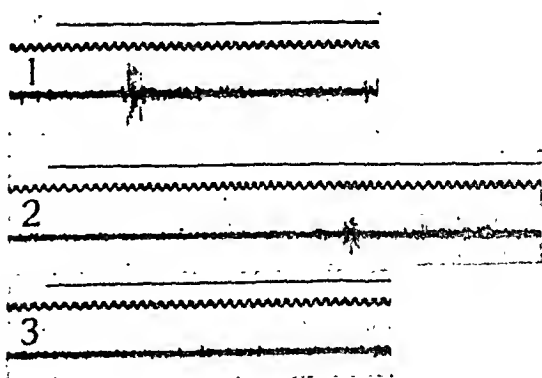


Fig. 2. Grouped discharge. Light and time signal as in fig. 1; 1, typical group near threshold at  $0.540 \mu$ ; 2 and 3 from another experiment. Same wave-length and successive records at respectively  $68$  and  $70 \text{ mm.}$  on wedge, the former just above, the latter just below threshold.

is difficult to say whether this is a physiological variation in the discharge of a single unit or whether the group consists of several units with some rotation of activity (GRANIT, 1941 a). Nevertheless this group acts as a physiological unit to variations of colour around the threshold. Such "grouped discharges" have also been described by *e. g.* FORBES and his collaborators (RENSHAW, FORBES, and MORISON, 1940) in the hippocampus area and by ADRIAN and MORUZZI (1940) in the spinal cord.

## 2. Dark-Adaptation.

After light-adaptation the frog's spectrum generally has its maximum around  $0.560 \mu$  with individual elements possessing maxima still further out in the long wave-lengths. Immediately afterwards the sensitivity begins to increase. A typical case is shown in fig. 3, where the relative energies at the threshold ( $E$ ), the inverse value ( $1/E$ ), and  $\log E$  have been plotted against time of recovery in the dark for a diffuse discharge and wave-length  $0.500 \mu$ . The two-step rise of sensitivity can be seen in all curves. The logarithmic plot is commonly used in sensory

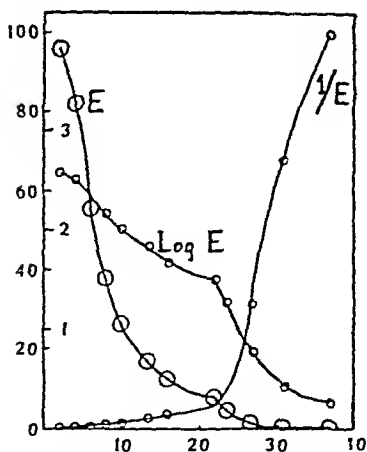


Fig. 3. Hungarian frog. Dark-adaptation of restricted discharge followed by measurements of absolute threshold for wave-length  $0.500 \mu$ . Abscissae: time in the dark in min. Ordinates:  $E$ , relative energy necessary for threshold, in addition  $1/E$  and  $\log E$  have been plotted. To be compared with curves showing regeneration of visual purple in excised, opened eyes by ZEWI (1939).

work and has obvious advantages. The theoretically best plot is perhaps  $1/E$  illustrating sensitivity — originally used also in psychophysical sensory work — since with the rat's eye, having very few cones, as well as with dark-adapted frogs a plot of  $1/E$  against the wave-lengths of the spectrum has been shown to follow the absorption curve for visual purple (cf. CHAFFEE and HAMPSON, 1924, GRAHAM and RIGGS, 1935, GRANIT, 1941 c). The two phases of dark-adaptation, seen in fig. 3, are known since the work of KOHLRAUSCH (1922) for the human eye, and have been demonstrated electrophysiologically by a number of authors (GRANIT and WREDE, 1937, WREDE, 1937, RIGGS, 1937 for frogs; GRANIT, 1941 c for rats). It can be shown that the red

end of the spectrum does not take part in the second phase of the rise of sensitivity. This is illustrated by the uppermost curve of fig. 4. The same holds good for man.

Independently of the degree of isolation reached with the micro-electrode the second phase of dark-adaptation nearly always sets in. This phase goes with a shift in the absorptive properties tending to place the maximum of sensitivity around  $0.500 \mu$ . With some justification it may thus be called dark-adaptation proper, meaning that the elements under the micro-electrode begin to react as they would do if their sensitivity were determined by visual purple. As we have pointed out elsewhere, the increasing sensitivity of rod vision is not proportional to the increase in the concentration of visual purple, as studied by ZEVI (1939) on frogs. This statement holds good both when size of the electroretinogram is used as index (GRANIT, HOLMBERG, and ZEVI, 1938, GRANIT, MUNSTERHJELM, and ZEVI, 1939), as well as when the index is sensitivity ( $1/E$  in fig. 3). There is a period of delay in the rise of sensitivity of the rods but none whatever in the general rise of sensitivity nor in the regeneration of visual purple unless light-adaptation be very brief and intense (ZEVI, 1939). During this early period of increasing sensitivity the eye reacts as a cone-eye with a broadening photopic maximum around  $0.560 \mu$ .

The work in which size of the electroretinogram to a constant stimulus was used as index of sensitivity in parallel with measurements of visual purple concentration (GRANIT *et al.*, 1938, 1939) cannot be directly compared with these experiments where the index has been energy necessary for the threshold, even though both sets of results are presented in a common unit such as  $1/E$ . The experimental conditions are too different. Thus it is important to realize that the intensity level of the constant stimulus, used for eliciting an electroretinogram, indicates incipient dark-adaptation at an earlier stage if the stimulus is of very low intensity than when it is of high intensity (GRANIT and WREDE, 1937, RIGGS, 1937), and that it is difficult to use so low intensities in work with the electroretinogram as to approach the condition that a few spikes just are allowed to pass through the micro-electrode. The latter also selects the most sensitive elements at their threshold while the great majority of elements, summing up to a measurable retinogram, still may be uninfluenced by dark-adaptation. Further, the size of the electroretinogram is proportional to  $\sqrt{E}$  (BOVIE, CHAFFEE, and HAMPSON, 1924) and therefore must increase very slowly in the early critical period of dark-adaptation, if not replotted in terms of some other unit. For these reasons the micro-



electrode technique should show up dark-adaptation before it is clearly visible in the deflection of the retinal response to a constant stimulus. The time and strength of light-adaptation also is of importance. In the work of RIGGS (1937) a short duration of light-adaptation and a weak adapting light were used.

The micro-electrode experiments on dark-adaptation were carried out after not less than 1 hour of light-adaptation to 20,000 m. c. in the same apparatus that was used by ZEWI (1939) in his quantitative measurements of visual purple regeneration under various conditions. His values for excised eyes can be directly compared with my curves. Visual purple regeneration is very much slowed down in excised eyes which lack the rapid regeneration component sensitive to temperature (ZEWI, 1939, 1940). In the intact animals a fast rise of the electroretinogram sets in when, during regeneration, the visual purple concentration has reached 50 % of its final value in frogs or cats. (GRANIT *et al.*, 1939). The fast rise, "dark-adaptation proper", of fig. 3, plotted from micro-electrode work in terms of  $1/E$ , sets in when 20 % of visual purple has regenerated in the excised eye. This difference between intact animals and excised opened eyes should be considered in the light of the remarks made in the previous paragraph.

Both methods demonstrate, the micro-electrode technique in addition with isolated elements, that cone-properties dominate until at a certain stage some "intermediate process" makes the visual purple an active rod-substance, and the maximum in the spectrum gradually shifts over to the region around  $0.500 \mu$ . (For a discussion of this intermediate process see GRANIT *et al.*, 1939, LYTHGOE, 1940, and GRANIT, 1941 c.)

Though most isolated elements dark-adapt and sooner or later become dominated by the photochemical properties of visual purple, there are some exceptions. One such case is shown in fig. 8 where the element with maximum in  $0.600 \mu$  did not change its absorption spectrum in the course of 40 min.

### 3. Dark-Adaptation and the "Blue" Receptor.

There can be no doubt but that the frog's retina possesses a "blue" substance. But for some reason or other the "blue" receptor is exceedingly difficult to isolate. However, by utilizing its adaptive properties significant results are obtained.

A most interesting case is the one shown in fig. 4 in which dark-adaptation was followed with a moderately restricted discharge for the wave-lengths 0.500, 0.650, 0.450  $\mu$  and plotted in terms of log intensity for a threshold response. The blue element (0.450  $\mu$ ) dark-adapts at a faster rate than the others so that between the 12th and 25th min. of dark-adaptation the maximum of the sensitivity is in the blue region. Later, during the second phase of dark-adaptation visual purple takes the lead and the maximum shifts towards 0.500  $\mu$ . As pointed out above, the

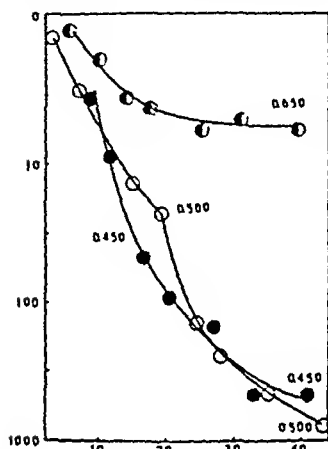


Fig. 4. The thresholds for three wave-lengths 0.650, 0.500, and 0.450  $\mu$  has been followed during dark-adaptation and plotted in terms of log energy necessary for discharge. Note fast recovery of "blue" (0.450  $\mu$ ). Time in minutes.

purple outside 0.620  $\mu$ . It is a characteristic of the "blue" substance that after light-adaptation it recovers even faster than the region influenced by visual purple. This circumstance enabled GRANIT and WREDE (1937) for the first time to place its existence beyond doubt, though at that time only the spectra and not the recovery curves were measured.

What is the absorption spectrum of the blue substance? Fig. 5 shows the distribution of sensitivity for an off-discharge of a highly restricted character for which the index was cessation of flicker. It is plotted in terms of  $1/E$ : immediately after a light-adaptation of 2 hours (lowest curve), somewhat later (middle curve), and still later (uppermost curve). There the blue sensitive maximum is between 0.450—0.460  $\mu$ . An isolated grouped dis-

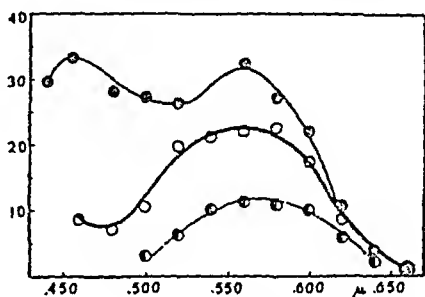


Fig. 5. Spectra for three stages of "recovery" after light-adaptation of restricted discharge. Ordinates: inverse value of energy necessary for threshold but not, as usual, in per cent of the maximum. Therefore the three curves also show three levels of increasing sensitivity. See text.

extreme red (0.650  $\mu$ ) does not take part in the second phase of dark-adaptation probably owing to the negligible absorption which characterizes visual

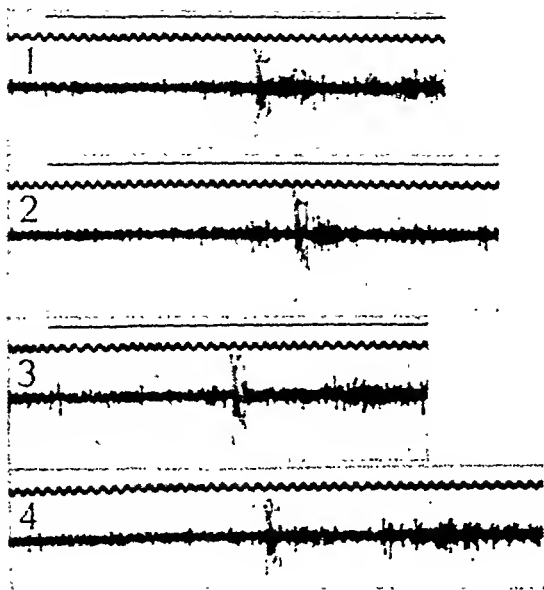


Fig. 6. Blue-sensitive grouped discharge giving sensitivity distribution shown in fig. 7. All values near threshold; only the grouped discharge audible in loud-speaker as sharp rattle. 1, wave-length  $0.670 \mu$ ; 2,  $0.530 \mu$ ; 3,  $0.500 \mu$ ; 4,  $0.450 \mu$ . Note, that the small inaudible discharge of spikes is less sensitive to short wave-lengths to judge by the fact that its latent period increases downwards in the records as wave-length shortens.

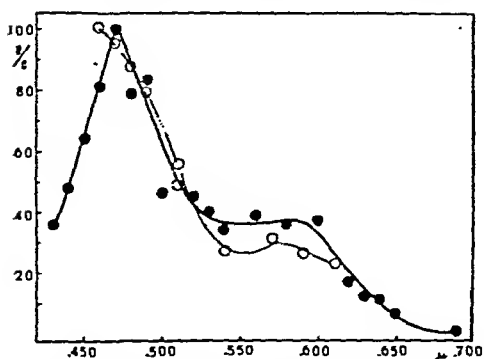


Fig. 7. Filled circles: distribution of sensitivity of the "grouped" discharge shown in fig. 6. Open circles: another "blue" receptor, less completely analyzed. Here, as in all curves to follow, the inverse value of energy necessary for the threshold has been plotted in per-cent of the maximum.

regeneration of visual purple. Also in the human eye sensory "blue" recovers faster than other colours (WRIGHT, 1937).

charge of a blue-sensitive element for which a complete curve was obtained is shown in fig. 6; its sensitivity distribution illustrate the filled circles of fig. 7. The open circles in the same fig. belong to another case in which the maximum sensitivity also was in the blue region but placed somewhat further out in the short wave-lengths. In other experiments the "blue" substance has merely made itself felt as an expansion of the curves in the short wave-lengths outside the absorption curve for visual purple. The "blue" elements are

so rare in the isolated stage that it is not possible to state whether they consist of a number of somewhat different narrow sensitivity bands, or whether the variations obtained merely are due to the limited number of observations available. The most striking property of "blue" elements apart from their distribution of sensitivity, is their fast recovery after light-adaptation, when compared with the rise of sensitivity directly due to

#### 4. The Red-Sensitive and Green-Sensitive Elements.

As pointed out already by GRANIT and SVAETICHIN (1939) one often obtains relatively narrow sensitivity bands outside the average maximum of light-adapted eyes (in  $0.560 \mu$ ). I have confirmed this observation and come to the conclusion that the maxima of such elements are located between  $0.580$ — $0.600 \mu$ . Specimens of such elements are given in fig. 8. I have never seen a maximum beyond  $0.600 \mu$ . When, however, the maximum shifts to  $0.560 \mu$  or has been there from the beginning, the curves tend to become broad.

An example of broad curves with maximum in  $0.560 \mu$  is shown in fig. 9 which is an average of several such elements. The curve practically coincides with the average curve for light-adapted frogs published by GRANIT and SVAETICHIN. The latter has only a still more marked expansion in the blue region. For some time I suspected this curve to indicate that several units took part in the response. But then I succeeded in establishing that similar curves also could be obtained when to all appearance a single unit was active. The broad curve with maximum around  $0.560 \mu$  is the most common curve of all.

Maxima of sensitivity are also found in the region of

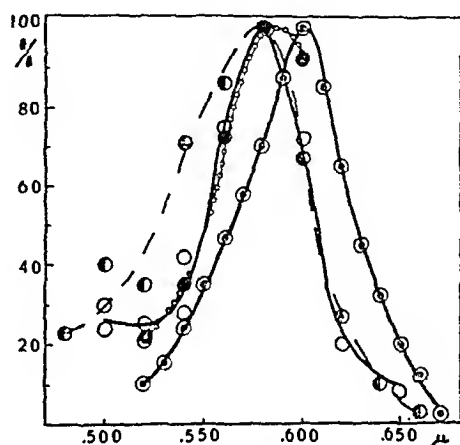


Fig. 8. Types of isolated photopic receptors with narrow bands sensitive to the red and yellow regions of the spectrum ( $0.580$ — $0.600 \mu$ ). Some show indication of beginning rise of sensitivity in the region of the maximum for visual purple ( $0.500 \mu$ ).

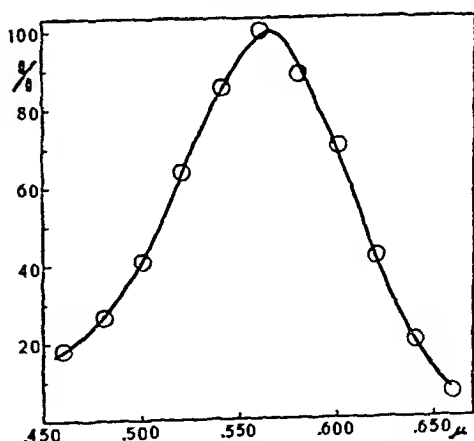


Fig. 9. Photopic elements with broad band of sensitivity with maximum around  $0.560 \mu$ . Average curve (see text).

0.520—0.540  $\mu$ . Such curves are shown in fig. 10 and they also belong to the narrow type. GRANIT and SVAETICHIN (1939) discussed the possibility that these curves represented a certain amount

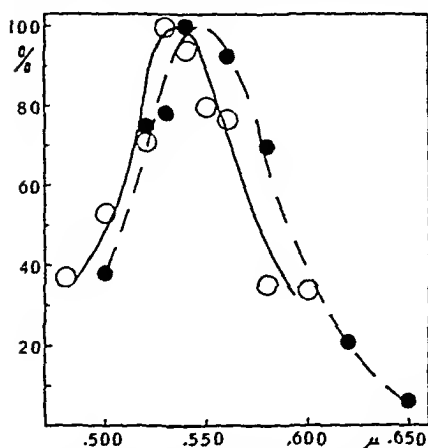


Fig. 10. Types of isolated photopic receptors with narrow bands sensitive to green, 0.560—0.540  $\mu$ .

of dark-adaptation of elements with maxima in 0.560  $\mu$ . I have since come to the conclusion that elements of this type are genuine. Isolated units have been seen to have this type of distribution of sensitivity so soon after light-adaptation that participation of active visual purple should be excluded. I have also seen them in the photopic eyes of guinea-pigs in which so far I have not found any maxima outside 0.540  $\mu$ .

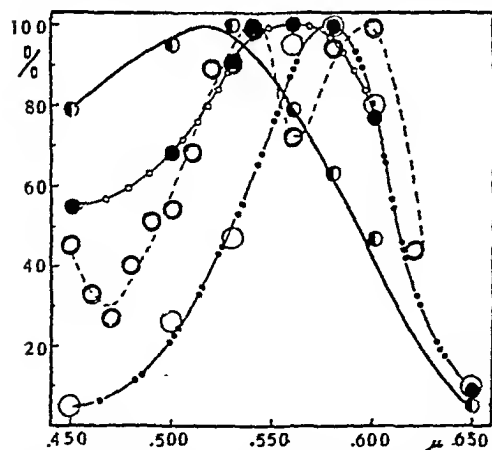


Fig. 11. Types of curves showing variations in the distribution of spectral sensitivity. See text.

(GRANIT, 1941 b) and formation of visual purple to be considered as factors antagonizing isolation. Briefly, it can be stated that, even when neglecting a source of error such as the dimensions of the micro-electrode itself, there is a great

It would be a mistake to believe that all curves have been as simple as those shown above. In order to illustrate how complex the results can be I have added fig. 11, without being able to state that such curves refer to single units of activity. But they do represent a high degree of isolation. On the other hand it should be realized that units may be coupled physiologically in the synaptic layer, that "double cones" have been described by the histologists, and that even the micro-electrode by causing irritation due to pressure may force elements to act in unison. There is also "rotation of activity"

number of complicating factors left, all of which conspire to antagonize isolation. For this reason the narrow curves that have been obtained have the great value of positive evidence.

### Discussion.

BIRUKOW (1939) has recently studied colour discrimination in frogs and finds that they are capable of distinguishing colours. Very precise information can hardly be obtained on the basis of an analysis of animal behaviour, but it seems as if frogs had a type of colour system reminiscent of that in man, only with less developed sensitivity to green.

Assuming now that we have discovered all the important types of elements in frogs, what conclusions would offer the most reasonable description of colour vision in this animal? Would it be necessary to suggest a "polychromatic" theory of vision? What would, in the first instance, be the equivalent of brightness? There is every reason to suppose that the average photopic curve with its maximum around  $0.560 \mu$  (GRANIT and SVAETICHIN, 1939) determines brightness in frogs just as in man. Perhaps brightness or "whiteness" in the frog has a slightly more blueish tinge. On this view brightness would be determined by the total number of impulses from the dominant receptors. The size of the electroretinogram in different regions of the spectrum would also give a good idea of the brightness distribution (GRANIT and WREDE, 1937, for photopic eyes).

It must have some significance that the majority of the curves obtained from photopic frogs tend to coincide with the average curve (see fig. 9). Brightness, after all, must be the fundamental quality of visual reception. It is hardly likely that the broad curves initiate impressions of any particular colour. They do differ to some extent from each other but it is not possible to state definitely that these differences exceed the limits of variations set by the difficulties of the experiment.

Colour must be the result of the amount of discrimination caused by sensitivity bands serving as "modulators" of the average curve and of the dominant type of distribution of sensitivity. Such "modulators" have also been found in a sufficient number and sufficiently far apart to serve, as it were, as landmarks for colour discrimination. We have seen that maxima of individual sensitivity bands may turn up within as large a range as from

0.450—0.600  $\mu$ . They have also tended to be grouped around certain regions of the spectrum. One such region of "modulators" has been 0.580—0.600  $\mu$ , less commonly maxima have been seen between 0.520—0.540  $\mu$ , and relatively rarely between 0.450—0.470  $\mu$ . Statistical averages of the "modulator" groups actually have three preferential regions, and on this basis it is possible to suggest a trichromatic theory instead of a polychromatic one. The sensitivity bands of these regions have also tended to be narrower than the average curve and that of dominating elements possessing the maximum of the latter. Therefore it is reasonable to assume that maxima of discrimination are to be found precisely in these regions. Discrimination would thus be a function of the number, steepness and density of these "modulators".

In the photopic rat's eye (GRANIT, 1941 c) there were only two narrow "modulator" bands with maxima in respectively 0.600 and 0.500  $\mu$  coupled together. The "dominating" element with maximum in 0.560  $\mu$  was lacking. The former band showed the characteristic two-step rise of recovery after light adaptation and during the later phase became transformed into a visual purple absorption curve. This led to the assumption that the perception of green of the photopic eye in this case was mediated by slightly modified visual purple. It is possible that visual purple behaves similarly in the frog's eye which implies that the maximum of discrimination in the green would shift towards 0.500  $\mu$ . If this were so, all the maxima of discrimination in the frog's eye would coincide with the maxima of hue discrimination of man, as determined, for instance, by WRIGHT and PITT (1934). Otherwise the "green" maximum would be slightly shifted to the right in comparison with man.

The broad curve of the dominating element of fig. 9 could be due to a coupling of the narrow curves which have maxima to either side of it, as indicated by fig. 12 in which some typical responses for the sake of comparison have been plotted to the same abscissa. The coupling might be "photochemical" in the sense that the substances are mixed already in the receptors, or physiological, meaning that different receptors are interconnected either as "double cones" or else in the synapses. As is well known there is in the retina convergence of receptors and bipolars towards the final common path taking its origin from the ganglion cell from which the micro-electrode picks up the

discharge (GRANIT, 1941 a). Thus, for instance, when a cone during dark-adaptation changes into a rod the reason for this probably is convergence.

Elsewhere (GRANIT, 1941 c, d) I have given experimental reasons for assuming the cone substances to be chemically related to the visual purple. So far only yellow substances have been found in solutions of bleached visual purple, substances such as the relatively light-resistant "indicator yellow" (LYTHGOE, 1937) or "retinine" (WALD, 1936, 1939) and the labile "transient orange" (LYTHGOE and QUILLIAM, 1938) which may account for the reception of blue. The work of HANSTRÖM (1940) indi-

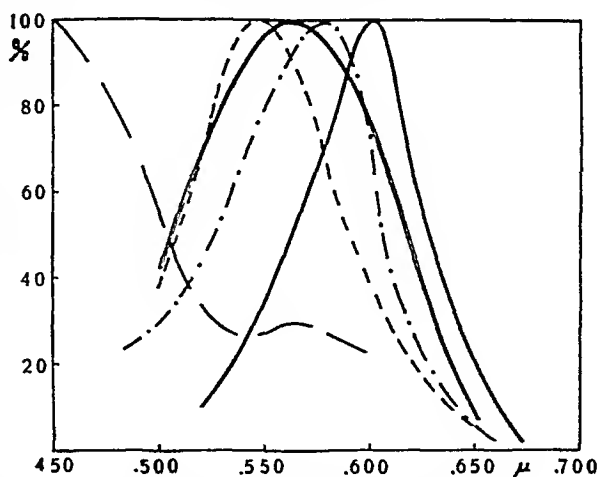


Fig. 12. Some of the previous curves plotted for comparison to the same abscissa.

cates the presence of a red substance in extracts from eyes of monkeys. v. STUDNITZ (see his book, 1940) claims to have found a substance in the frog's eye with maximum in  $0.560 \mu$  and fitting our average photopic curve of this animal, but, on the other hand, he finds the same substance in the eye of the tortoise where the physiologically determined maximum is located between  $0.600$ — $0.620 \mu$  (GRANIT, 1941 a, d). It is therefore doubtful whether his methods are adequate enough to support his claims.

### Summary.

Spikes have been recorded with micro-electrodes, amplifier and cathode ray oscillograph from the retinae of light-adapted frogs and during dark-adaptation.

The chief aim of this work has been to collect a large number of curves showing the distribution of sensitivity to spectral light of single or a restricted number of elements.

Most elements have a distribution of sensitivity which coincides with the average curve with its maximum in  $0.560 \mu$  and



legs extending over a relatively large part of the spectrum (see fig. 9).

But there are also narrow bands of sensitivity with maxima ranging between  $0.450\text{--}0.600\ \mu$ . The maxima of these bands are chiefly gathered around  $0.580\text{--}0.600\ \mu$ ,  $0.520\text{--}0.540\ \mu$ , and  $0.450\text{--}0.470\ \mu$ . Curves from the last mentioned group are rare.

Curves illustrating dark-adaptation (or recovery of sensitivity) for different wave-lengths are given in the paper and compared with visual purple regeneration.

The blue-sensitive elements recover at a faster rate than others after light-adaptation and in this way can also be isolated from the region around  $0.500\ \mu$  occupied by the absorption band of visual purple.

The kind of mechanism of colour reception that might be expected from such a system is briefly discussed, and it is suggested that in many respects it may be very like that of man.

The author is indebted to the Rockefeller Foundation for support.

#### References.

- ADRIAN, E. D., and G. MORUZZI, *J. Physiol.* 1940. *97*. 153.  
 BIRUKOW, G., *Z. vergl. Physiol.* 1939. *27*. 41.  
 CHAFFEE, E. L., W. T. BOVIE and A. HAMPSON, *J. opt. Soc. Amer.* 1923. *7*. 1.  
 CHAFFEE, E. L. and A. HAMPSON, *Ibidem.* 1924. *9*. 1.  
 GRAHAM, C. H., and L. A. RIGGS, *J. gen. Psychol.* 1935. *12*. 279.  
 GRANIT, R., *Acta Physiol. Scand.* 1941 a. *1*. 370.  
 —, *Ibidem.* 1941 b. *1*. 386.  
 —, *Ibidem.* 1941 c. *2*. 93.  
 —, *Ibidem.* 1941 d. *2*. 334.  
 GRANIT, R., and A. MUNSTERHJELM, *J. Physiol.* 1937. *88*. 436.  
 GRANIT, R., and G. SVAETICHIN, *Upsala Läkaref. Förhandl. N. F.* 1939. *45*. 161.  
 GRANIT, R., and C. M. WREDE, *J. Physiol.* 1937. *89*. 239.  
 HARTLINE, H. K., *Amer. J. Physiol.* 1938. *121*. 400.  
 HIMSTEDT, F., and W. A. NAGEL, *Ber. naturf. Ges. Freiburg i. B.* 1901. *9*. 153.  
 HANSTRÖM, E., *Acta Opthhal. Kbh.* 1940. *18*. 21.  
 KOHLRAUSCH, A., *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1922. *196*. 113.  
 LYTHGOE, R. J., *J. Physiol.* 1937. *89*. 331.  
 —, *Brit. J. Ophthal.* 1940. *24*. 21.  
 LYTHGOE, R. J., and J. P. QUILLIAM, *J. Physiol.* 1938. *94*. 397.  
 RENSHAW, B., A. FORBES and B. R. MORISON, *J. Neurophysiol.* 1940. *3*. 74.

WALD, G., *J. gen. Physiol.* 1935—36. *19*. 351.

—, *Ibidem.* 1939. *22*. 775.

WREDE, C. M., *Skand. Arch. Physiol.* 1937. *77*. *Proc. Physiol. Soc.*

WRIGHT, W. D., *Proc. Roy. Soc. B.* 1934. *115*. 49.

WRIGHT, W. D., and F. H. G. PITT, *Proc. Physiol. Soc.* 1934. *46*. 459.

ZEWI, M., *Acta Soc. Sci. Fenn. N. S.* 1939. *2*. 4.

—, *Acta Physiol. Scand.* 1940. *1*. 271.

## On the Significance of the Presso-Sensible and the Chemo-Sensible Reflexes in the Regulation of the Cardiac Output.

By

ERLING ASMUSSEN and E. O. E. KNUDSEN.

(Received 29. September 1941.)

---

When a subject is placed on a tilting board and tilted passively to an upright position his pulse rate will increase and his cardiac output will diminish, whereas his systolic blood pressure generally will show but slight alterations. The observed changes are closely correlated to the shift of blood from the trunk to the lower extremities which occur on tilting (ASMUSSEN, CHRISTENSEN and NIELSEN (1939)). A decreased ability for absorption of water from the intestine in the head up position was by the same authors assumed to indicate an impaired circulation in the splanchnic area, and NIELSEN, HERRINGTON and WINSLOW (1939) could demonstrate, that the skin temperature decreased on tilting to a head up position, indicating a constriction of the cutaneous vessels. The pulse accelerations and the vaso-constrictions, which occur on tilting, must be assumed to be parts of presso-sensible reflexes, evoked through the presso-sensible zones of the carotid sinus and aortic arch, and tending to keep the blood pressure normal under the strain put upon the circulation by the impaired return flow of blood to the heart. However, even though the blood pressure is kept normal by the above mentioned compensation, it is constantly found, that the cardiac output is diminished in the upright position, and very often it keeps on decreasing till syncope and collapse occur. The question now arises, — is the cardiac output in the tilted position low because the hæmodynamic and hæmostatic conditions in this position make a maintenance of an adequate cardiac output impossible — or is it low because the presso-sensible reflexes,

evoked by the threatening fall of blood pressure, do not include such impulses as would raise the cardiac output?

In the former case one might expect, that an additional stimulation of the circulatory center would be without any effect on the cardiac output, whereas in the latter case a proper stimulation of the circulatory center should be followed by an increased cardiac output. Work and low arterial  $O_2$ -tensions are known to increase the cardiac output under ordinary conditions. It has previously been demonstrated (ASMUSSEN and CHRISTENSEN 1939), that work is able to increase the cardiac output even when it has been lowered as a result of pooling of blood in the lower extremities; and it is the purpose of this paper to ascertain, whether a low arterial  $O_2$ -tension is able to increase the cardiac output after it has been lowered by tilting the subject to  $+60^\circ$ .

All determinations were made on the subject E. A. (33 years, 70 kg 172 cm), whose reactions on tilting and on low arterial  $O_2$ -tensions are well known from earlier experiments. The experiments were made in the morning under basal conditions. The subject rested on the tilting board for about an hour before any determinations were made. The tilting board could be tilted to any angle between horizontal and 60 degrees. In this position — (hereafter called  $+60^\circ$ ) the buttocks of the subject rested on a bicycle seat, whereas his feet were unsupported. The metabolism was determined by the Douglas-bag method, and the cardiac output by the Grollman-method (acetylene method). In the experiments with low  $O_2$ , care was taken that the average alveolar  $O_2$ -tension during the rebreathing period of the cardiac output determination, did not differ more than  $\pm 2$  mm from the alveolar  $O_2$ -tension determined previously by means of Haldane-Priestley samples. The pulse rate was counted by palpation on the wrist and the arterial blood pressure was measured in the usual manner on the upper arm. In the experiments with low  $O_2$  the subject breathed from a large gasometer, which could be filled with mixtures of  $N_2$  and atmospheric air to give the desired  $O_2$ -content. In our experiments an  $O_2$ -content of about 10 % was used. All gas-analyses were carried out on the Krogh-Haldane apparatus.

The results of our experiments are averaged in table 1.

Table 1.

Subject E. A.	Pulse	Blood pressure mm Hg.	a.—v. $O_2$ -diff. cc/l.	Card. output l/min.
Horizontal, normal air . . . . .	54	100/80	47	5.1
Horizontal, low $O_2$ . . . . .	73	105/85	28	8.0
$+60^\circ$ , normal air . . . . .	72	100/85	58	4.1
$+60^\circ$ , low $O_2$ . . . . .	90	95/80	46	5.0

It will be seen that in E. A. the cardiac output diminishes from 5.1 l/min. to 4.1 l/min. when he is tilted from the horizontal to the  $+60^\circ$  position. The systolic blood pressure is unchanged and the pulse rate increases 33 per cent. If at this time the subject breathes air containing only 10 per cent  $O_2$  the effect will be as shown in the fourth line: i. e. the cardiac output increases to 5.0 l/min. This increase is rather small compared with the increase which occurs in breathing low  $O_2$  in the horizontal position (5.1 to 8.0 l/min.). Together with the high pulse rate and the somewhat diminished systolic blood pressure in the  $+60^\circ$  position in low  $O_2$  this no doubt indicates that the  $+60^\circ$  position puts a more severe strain on the regulating mechanisms when the  $O_2$ -tension is low than when it is normal.

The fact that the cardiac output increases, when low  $O_2$  is breathed in the  $+60^\circ$  position, could be interpreted as the effect of the simultaneously increased ventilation, which might be assumed mechanically to improve the return flow of blood to the heart. That this is not the case could be shown by experiments, in which the subject breathed air containing 6 per cent  $CO_2$ , giving a ventilation of about 30 l/min. compared with the 8.6 l/min. in low  $O_2$ . Table 2 shows the result on the circulation.

Table 2.

Subject E. A.	Pulse	Blood pressure mm Hg.	a.-v. $O_2$ -diff. cc/l.	Card. output l/min.
$+60^\circ$ , $CO_2$ . . . . .	72	100/90	57	4.2

It will be noticed, that although the ventilation here was much increased, the effect on the cardiac output was practically nil. (It might be worth mentioning at this point, that the effect of an increased breathing on the circulation rate is very considerable in the *horizontal* position. We found: pulse rate: 60, blood pressure: 105/85, a. v.  $O_2$ -diff.: 31, cardiac output: 8.4 and a stroke vol. of 140 cc. It seems quite natural, that an increased negativity of the thoracic pressure is able to accelerate the return flow of blood to the heart in the *lying* position, without being able to cope with the diminished central venous pressure in the tilted position). It is consequently justifiable to conclude, that it is the stimulation of the chemosensible zones by the low arterial  $pO_2$  which increases the cardiac output also in the  $+60^\circ$  position.

When the cardiac output in the tilted position is low, and

often falls to values which threaten the adequate blood supply of the organism, then this is not because the organism is unable to increase the cardiac output in this position, but the reason must be, that the circulatory center is not stimulated to give any increase. The threatening fall of arterial pressure is compensated by the *presso-sensible* reflexes, as indicated by the high pulse-rate, but these reflexes apparently do not involve such steps as would increase the cardiac output. In many subjects the cardiac output will continue to decrease until the limit of the presso-regulation is reached, after which syncope and collapse will occur. The reflexes set up by the *chemo-sensible* mechanisms, and the adaptations, which follow the onset of *work*, do call forth an increase of the cardiac output, even when, as in the tilted position, the return flow to the heart is impaired. They must therefore include further regulatory steps, than do the presso-sensible reflexes. The nature of these steps has not been ascertained, but it seems quite natural to think of an emptying of the blood depots as one of the more important adjustments involved.

### Summary.

In the  $+60^\circ$  position on a tilting board, the cardiac output diminishes although the presso-sensible mechanisms keep the blood pressure approximately normal. If in this position the subject breathes air, low in  $O_2$ , the cardiac output will increase. This shows, that the lowered cardiac output in the tilted position is not simply due to mechanical hindrances for the circulatory center to maintain an adequate circulation rate, but rather to the fact, that the *presso-sensible* reflexes do not include such steps as will bring forth an increase in the cardiac output. The *chemo-sensible* reflexes and the reflexes evoked by the onset of *work*, do include such measures.

### References.

- ASMUSSEN, E., E. H. CHRISTENSEN and MARIUS NIELSEN: Skand. Arch. Physiol. 1939, 81, 214.  
ASMUSSEN, E. and E. H. CHRISTENSEN: Skand. Arch. Physiol. 1939, 82, 185.  
NIELSEN, MARIUS, L. P. HERRINGTON and C. E. A. WINSLOW: Amer. J. Physiol. 1939, 127, 573.
-

## On the Determination of the Blood Volume by the CO-Method.

By

ERLING ASMUSSEN.

(Received 29 September 1941.)

Determinations of the blood volume might be carried out for two different purposes: One might be to determine the absolute blood volume; another to follow changes in the blood volume of a subject during an acute experiment. In the first case isolated observations generally suffice. In the second case the possibility of making several determinations within a limited time and an accurate timing are often necessary. It is obvious, that a method which yields good results in the former case might prove less ideal in the second case.

The two methods for blood volume determinations now generally employed are 1) the injection method, and 2) the inhalation method. The first of these methods has been much used and discussed (for references see: FLEISCHER-HANSEN (1928), ROWNTREE, BROWN and ROTH (1929), ERIN MADSEN (1936), GIBSON and EVELYN (1938)). Injections have been made of dyes such as vital red and T-1824 or of more specific substances such as antidiphtherie serum. The main sources of error in this method are: incomplete mixing of the injected substance with the blood, and the disappearance of the substance from the blood. However, special precautions against these errors have been suggested, e. g. the introduction of mixing movements by LINDHARD (1926) and the extrapolation method of GIBSON and EVELYN (1938). GIBSON and EVELYN determine the elimination curve of the injected dye, and extrapolate backwards to the time of injection. The extrapolated value at this time is

used in the estimation of the blood volume. It is by means of this method, possible to obtain accurate determinations of the absolute plasma and blood volume at the time of the injection. A continuous determination of the blood volume by this method is, however, rather uncertain as changes in plasma volume during the experiment only can be detected as deviations of the actual elimination curve from the trend of a normal elimination curve, unless renewed injections of the dye are made. As furthermore, the dye persists in the blood for up to two weeks, the possibilities of repeated determinations are limited.

The inhalation method was first introduced by GRÉHANT and QUINQUAUD, (1882) later simplified by HALDANE and LORRAIN SMITH (1899) and by DOUGLAS (1910). The gas used by these and other authors was CO. The main source of error in this method is the disappearance of the gas from the blood into the myoglobin, whereas a satisfactory mixing can be obtained if the rebreathing is continued long enough. The advantages of the method are: it can be used for repeated determinations, it gives the blood volume at the time of the blood sampling, and the CO does not accumulate from day to day. One reason for which it has been partly abandoned was the difficulty of analysing the CO in the blood. The introduction of several volumetric and manometric methods for determining the CO in blood has now abolished this difficulty (see PETERS and VAN SLYKE (1932)).

It is the purpose of this paper to test the CO-method under various experimental conditions, to compare it with the injection method and eventually to point out when it can be used with advantage.

The CO was prepared by mixing even volumes of concentrated formic acid and concentrated sulphuric acid. The gas formed was bubbled through a washbottle containing a solution of sodium hydroxide and collected under slight positive pressure over water. In order to check the purity of the gas, samples of it were analysed on the Van Slyke apparatus (method of SENDROY and LIU). For use a certain amount (100—200 cc. at prevailing barometric press. and temp.) was transferred to the rebreathing chamber by means of a 100 cc. glass syringe. As a rebreathing chamber we used the Krogh metabolism-apparatus. It was flushed several times with atmospheric air, before the CO was introduced, followed by 1 to 2 litres of O<sub>2</sub>. The inspiratory and expiratory tubes were closed during this procedure by means of clamps. The subject breathed through valves and mouthpiece, his nose being closed by a noseclip. As the O<sub>2</sub> in the chamber was used and the soda lime absorbed the CO<sub>2</sub>, new O<sub>2</sub> was admitted in small doses.



Care was taken to keep the volume of gas in the apparatus at about the initial level in order to keep the  $N_2$ -tension of the blood normal. The volume of the closed system, rebreathing chamber — lungs, was relatively large (10 to 15 litres) so that an appreciable time was necessary to secure a perfect mixture of the air and a complete absorption of the CO. In other experiments, therefore, a much smaller rebreathing chamber was used, consisting of a Grollman-bag (2—3 litres) and a glass cylinder (0.5 l.) for the soda lime. A complete mixture of the gases in the lungs and the chamber could be secured in less than a minute by slightly forced breathing.

Blood samples for the CO determination were drawn from a cubital vein in oiled syringes and transferred to glass tubes containing a drop of heparin solution under oil. The tubes were placed on ice and the blood analysed after VAN SLYKE and NEILL within 2—3 hours. The CO is determined as the residual gas after absorption of the  $O_2$  and  $CO_2$  and subtraction of 1.2 Vol% of  $N_2$ . We have confirmed the validity of this correction on several occasions, and consequently only in cases when the subject had been smoking previously to the experiment, blank analyses of the blood were done. Smoking of 2—3 cigarettes in the hours before the experiment would leave about 1 Vol% of CO in the blood and consequently change this correction to more than 2 Vol%. The blood volume was determined as:

$$B = \frac{\text{CO administered (760 mm Hg., } 0^\circ, \text{ dryness)} \times 100}{\text{Vol\% CO in blood}}$$

The amount of CO left in the lungs and the rebreathing chamber is negligible, and no correction was made for it.

For comparison blood volume determinations by the injection method were done simultaneously in some experiments. The procedure was that of GIBSON and EVELYN, but in several cases the procedure of LINDHARD (mixing movements) was followed. The former method has the advantage, that one is not dependent on a single blood sample. The latter secures a more rapid mixing of the dye with the blood. The dye (T-1824) was determined in the serum by means of a photo-electric device, kindly put at our disposal by Dr. P. BRANDT REHBERG. The haematocrits were small glass tubes (0.5 cc), closed at one end, and divided by marks from 1 to 100. As anticoagulant was used heparin, dry or in solution in 0.9 % NaCl. Several haematocrits were made in each experiment, and the average used for determining the total blood volume.

From the literature one receives the impression, that the CO-method gives values of the blood volume, which are sometimes too low and sometimes too high, depending mostly on the length of the rebreathing period. We therefore tried to determine the effect of different rebreathing periods on the resulting blood volume values. Fig. 1 upper curve shows the result, when the CO was administered by means of the greater rebreathing cham-

ber, the lower curve when it was given by means of the smaller one. The very high values in the beginning of each experiment are no doubt due to the fact that it takes some time before the CO has been fully absorbed by the blood, and a longer time when the greater chamber is used. The upper curve shows, that an

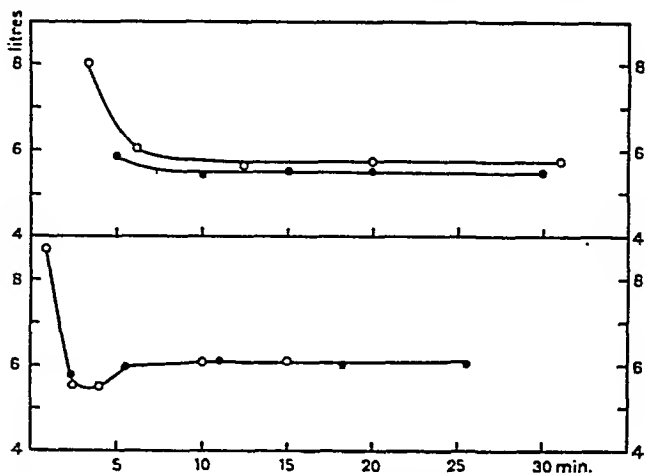


Fig. 1. Abscissae: Time in minutes after starting CO-breathing.  
Ordinates: Apparent blood volume in litres.  
Upper curves: 2 experiments on E.A. with greater rebreathing chamber (dead space 10 litres).  
Lower curves: 2 experiments on same subject with smaller rebreathing chamber (dead space less than 1 litre).

equilibrium is reached after 10 to 15 minutes of rebreathing. The blood volume determined from blood samples taken after this time will be constant as long as no CO disappears from the circuit. When the smaller chamber was used, it was commonly found, that after the first very high values some rather low values were obtained (see later), but then again after about 10 minutes a constant level was reached.

The effect of light muscular activity (360 kgm/Min., corresponding to an  $O_2$ -uptake of about 1.2 l/Min.) on the blood volume determined by CO can be seen in fig. 2. During the whole period the subject breathed through mouth-piece and valves from the Krogh-apparatus, into which the CO had been introduced. Obviously

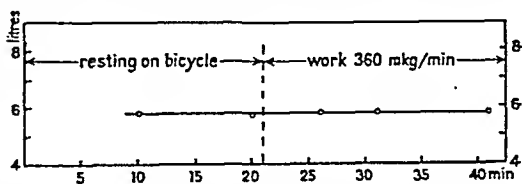


Fig. 2. Abscissae: Time in minutes after starting CO-breathing.  
Ordinates: Blood volume in litres.

this amount of work had no effect on the blood volume determined by CO.

Fig. 3 shows how the addition of an extra amount of blood could be detected. By means of pneumatic cuffs round the thighs a certain amount of blood was isolated in the legs. (Compare

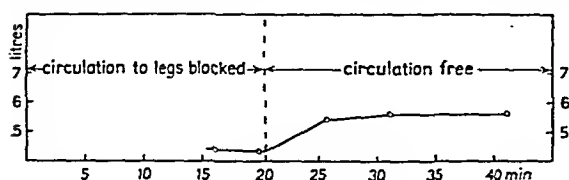


Fig. 3. As in fig. 2.

GROSSE BROCKHOFF and MOLINEUS (1940)).

The amount of blood in the rest of the body was then determined in the usual way, after which the cuffs were

deflated and a new series of samples was drawn. During the whole experiment the subject breathed from the Krogh-apparatus. Fig. 3 shows that the increase in blood volume is registered clearly. In another experiment of the same kind where the dye method was used simultaneously with the CO method the following values were obtained: before deflating the cuffs, dye method 4.7 L., CO-method 4.8 L.: after deflating the cuffs, dye method 5.6 L., CO-method 5.8 L.

A series of determinations on two subjects during a period of two to three months is shown in table 1. All determinations

Table 1.

Subject E. A. Male, 33 yrs. 70 kg. 172 cm.		Subject E. L. L. Female 33 yrs. 65 kg. 168 cm.	
Date 1941	Blood volume litres	Date 1941	Blood volume litres
2.—14. . .	5.3	2.—19. . .	4.9
2.—18. . .	5.8	2.—21. . .	4.6
2.—20. . .	5.6	3.— 4. . .	4.7
2.—22. . .	5.8	3.— 5. . .	4.3
2.—24. . .	5.7	3.— 6. . .	4.5
2.—26. . .	5.6	3.— 7. . .	4.5
2.—27. . .	5.6	3.—17. . .	4.65
3.— 6. . .	5.7	3.—20. . .	4.75
3.—13. . .	5.2	3.—24. . .	4.5
3.—14. . .	5.2	4.— 3. . .	4.6
3.—15. . .	5.0	4.—30. . .	4.8
3.—17. . .	5.3	5.— 1. . .	5.1
3.—20. . .	5.7		
3.—26. . .	5.8		
3.—31. . .	6.4		
4.—16. . .	5.6		
4.—25. . .	5.9		
4.—28. . .	6.1		

are made at least in duplicate from blood samples drawn 15—20 minutes after the beginning of the administration of CO.

A comparison between the values obtained by the CO-method (15—20 Min. rebreathing) and the dye-method, obtained from simultaneously made experiments on the subjects (15 experiments) is shown in table 2.

Table 2.

Date 1941	Subject	Sex	Age years	Weight kg.	Height cm	Blood vol. I CO litres	Blood vol. II T—1824 litres	$\frac{(I-II) \times 100}{II}$
3.—26. . .	E.A.	m	33	70	172	5.8	5.6	3.6
3.—31. . .	—	—	—	—	—	6.4	6.2	3.2
4.—16. . .	—	—	—	—	—	5.6	5.4	3.7
3.—24. . .	E.L.L.	f	33	65	168	4.5	4.0	12.5
4.—3. . .	—	—	—	—	—	4.6	4.1	12.2
3.—27. . .	E. Kn.	m	28	67	185	5.7	4.1	39.0
4.—4. . .	—	—	—	—	—	5.7	4.3	32.5
3.—28. . .	G.K.	m	42	45	160	3.2	2.5	28.0
3.—29. . .	F.L.	m	28	75	187	6.8	6.4	6.3
4.—2. . .	I.S.	f	26	59	168	4.4	3.6	22.2
4.—18. . .	A.N.	m	27	72	182	6.1	5.8	5.2
4.—21. . .	E.H.C.	m	36	77	180	5.7	5.2	9.6
4.—22. . .	G.L.	m	31	86	183	5.3	5.3	0
4.—23. . .	A.L.	f	33	75	171	6.1	5.5	10.9

It will be seen, that the CO-values in all cases are higher than (in one case equal to) the values determined by the dye. The difference is, however, varying from subject to subject, and no simple correlation to weight, sex, age etc. can be seen. It seems to be constant in the same individual, as the double or triple determinations on E. A., E. L. L. and E. Kn. indicate.

If we assume, that the dye-method gives correct values, then all the other values are too high. This is no doubt due to the disappearance of CO from the blood as it is taken up by the myoglobin.

The role of the myoglobin in taking up CO can be only roughly estimated. According to THEORELL (1934) its affinity for CO is 13.8 times greater than for O<sub>2</sub>, but the amount taken up at a given pCO varies with the pO<sub>2</sub> in the muscles<sup>1</sup> and is of course dependent on the total Mgb.-capacity, which is not known. The error introduced in the blood volume determination by CO is, therefore,

<sup>1</sup> At a pCO of 0.05 mm and a pO<sub>2</sub> varying from 0 to 20 mm the percentage of myoglobin bound to CO can be estimated to vary from 17 to 3. (Formulas in PETERS and VAN SLYKE, constants from THEORELL (1934)).

unpredictable and may vary between wide limits. It seems, however, to be fairly constant in the same subject even under different conditions such as rest and work (table 2 and fig. 2).

The low blood volume values found when the small rebreathing chamber was used and the blood samples were drawn after few minutes of rebreathing, may represent the true blood volumes,

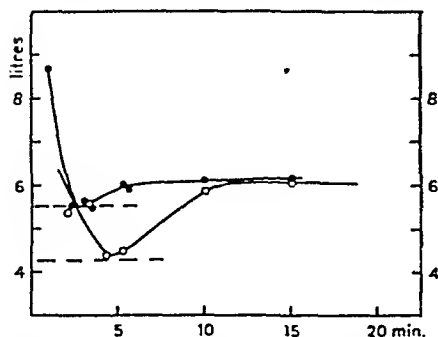


Fig. 4. ●—● Two experiments on E. A. and ○—○ one on E. Kn. by the CO-method, small rebreathing chamber. Dotted lines represent blood volumes on same subjects by the dye method.

as one might assume, that at this time the CO is taken up by the haemoglobin but has not yet passed over to the myoglobin. This assumption was strengthened by experiments on E. A. and on E. Kn. In E. A. the difference between the blood volumes determined by means of CO and dye was only 0.2 L., in E. Kn. it was 1.5 L. The results from CO-experiments with the smaller chamber on these subjects are

shown in fig. 4. It will be noticed, that there is a close relationship between the lowest blood volume values here and the values determined by the dye method. However, it must be admitted, that in a third subject no such close relationship could be found, the CO-blood volumes were high already from the start.

The CO method for determining blood volumes thus has the disadvantage, that no correction is possible for the CO which leaves the blood. Nevertheless it is our opinion, that it might be very useful, when rapid changes of the blood volume are to be determined, as the amount of myoglobin and presumably its  $O_2$ -tension (as indicated by the working experiments) do not change easily. We think it advisable to use the larger chamber and the longer rebreathing time (15—20), as this procedure gives the best reproducible values. It is emphasized, that the rebreathing must be continued until the last blood sample has been taken. It can not be recommended, as did GROSSE BROCKHOFF and MOLINEUS (1940), to discontinue the CO breathing and then to use the elimination curve of CO for extrapolating as GIBSON and EVELYN do with the dye T-1824. The elimination of CO through the lungs is not (as GROSSE BROCKHOFF and MOLINEUS seem to assert) dependent solely on the alveolar  $O_2$ -tension, but also on the

alveolar CO-tension and on the difference in CO-pressure between blood and alveoli. An increase in ventilation and circulation will consequently accelerate the elimination, and no conclusions concerning changes in blood volume or blood-depôts of the organism can be drawn from such experiments.

When used in the way described above the CO-method is a handy and timesaving method for determining a relative blood volume and changes in the blood volume. Its main advantages are the possibility of exact timing and the simple and easy analyses. For accurate determinations of the actual blood volume it is less advisable, because of the unpredictable rôle played by the myoglobin.

### Summary.

The CO-method for determining the blood volume has been tested under various conditions. When the CO is rebreathed from an ordinary metabolism apparatus (Krogh-apparatus or Benedict-Roth apparatus) constant values can be obtained after 10—15 minutes of rebreathing, also during moderate work. The blood volume values obtained in this way are higher than those obtained simultaneously by the injection method (T-1824). This is no doubt due to the myoglobin, which takes up an unpredictable amount of CO.

### References.

- DOUGLAS, C. G.: *J. Physiol.* 1910. *40*, 472.  
 FLEISCHER-HANSEN, C. C.: *Studier over Blodvolumen*, København, 1928.  
 GIBSON, J. G. jr and K. A. EVELYN: *J. clin. Invest.* 1938. *17*, 153.  
 GRÉHANT, M. and E. QUINQUAUD: *J. Anat., Paris.* 1882. *18*, 564.  
 GROSSE BROCKHOFF, F. and W. MOLINEUS: *Arch. Klin. Med.* 1940. *185*, 481.  
 HALDANE, J. S. and J. LORRAIN SMITH: *J. Physiol.* 1899. *25*, 331.  
 LINDHARD, J.: *Amer. J. Physiol.* 1926. *77*, 669.  
 MADSEN, E.: *Metode till Bestemmelse of Menneskets Blodvolumen ved Hjælp af Differantitoksin* (with an English summary) København. 1936.  
 PETERS, J. P. and D. D. VAN SLYKE: *Quantitative clinical chemistry*, Vol II. Baltimore, 1932.  
 ROWNTREE, L. G., E. G. BROWN and G. M. ROTH: *The volume of the blood and plasma.* Mayo clinic monographs 1929.  
 THEORELL, H.: *Biochem. Z.* 1934. *268*, 46.
-

## On the Biological Potency of $\beta$ -Carotene in Arachis Oil and in Margarine.

By

E. ABRAMSON and E. BRUNIUS.

(Received 3 October 1941.)

---

BOMSKOV and RUF (1940) investigated the influence of various fats on the absorption of carotene through the intestinal tract in rat. They found a rather good absorption of carotene from triolein, coconut fat and butter whereas only insignificant quantities were utilized from margarine. This they attempted to explain on the supposition that margarine fat lacks the power to stimulate bile secretion which is supposed to be essential for carotene absorption. They concluded that a vitaminization of margarine by the addition of carotene was at least very problematic if not completely meaningless.

The question of the utilization of carotene from margarine is of the utmost importance for Swedish conditions just now. Owing to the difficulty to obtain vitamin A concentrates in sufficient quantities it is planned here to undertake a vitaminization of margarine partially by means of carotene. It is obvious that the validity of BOMSKOV and RUF's statement must be of decisive importance for this plan. In view of this fact the concept of these authors was submitted to some control tests in this laboratory.

The method used by the German investigators consisted in a direct estimation of the quantity of carotene absorbed through the gut. Six hours after the administration of carotene the rats were killed and the intestinal wall along with the content was

extracted with alcohol and ether. The carotene content was then determined in the Pulfrich step photometer in petroleum ether. It is evident that this experimental procedure must involve a considerable uncertainty as also pointed out by the authors.

In the present study the problem was approached in a different way. In rat tests the biological activity of pure  $\beta$ -carotene dissolved in margarine was compared with that of  $\beta$ -carotene in arachis oil. It is obvious that by this procedure the utilization of  $\beta$ -carotene from margarine will be established merely in relation to that from arachis oil. From the evidence in the literature it appears however warranted to assume that  $\beta$ -carotene is in fact well utilized from arachis oil. In rat experiments DYER, KEY and COWARD (1934) demonstrated that carotene is equally well utilized from arachis oil as from coconut oil, the latter of which being the solvent used for the international  $\beta$ -carotene standard. As mentioned above BOMSKOV and RUF found a good absorption (approximately 40 %) of carotene from coconut fat.

### Experimental.

Crystalline  $\beta$ -carotene from Merck was dissolved in arachis oil and in melted vitamin-free margarine respectively.<sup>1</sup> The carotene concentration as ascertained by means of the Pulfrich step photometer was in both instances 10.5  $\gamma$  per g material. Control tests indicated that  $\beta$ -carotene remained stable in these preparations during the experimental period.

For the biological tests the curative "increase in weight" method was used. Young rats weighing about 30 g were given a vitamin A-deficient diet consisting of vitamin-free casein 20, hardened vegetable fat 10, rice starch 60 and Osborne-Mendel's salt mixture 5. In addition each rat received daily 0.5 g of irradiated dried brewer's yeast corresponding to 25 I.U. vitamin B<sub>1</sub> and 2 I.U. vitamin D. As the animals ceased to grow and began to develop xerophthalmic symptoms, which usually happened after 4 weeks, the test substances were given. The rats were divided into three groups, one receiving vitamin-free margarine and the other two  $\beta$ -carotene dissolved in arachis oil and in margarine respectively. The arachis oil used was not tested separately. In previous control experiments it had proved to be entirely free from vitamin A-activity.

---

<sup>1</sup> The vitamin-free margarine sample was placed at our disposal from Agra Margarinfabrik, Stockholm, at the end of January 1941. The arachis oil preparation originated from Karlshamns Oljefabriker. — The experiments herein reported were performed in January to April 1941.



Rat No.		Preparation given	Days	Increase in weight g	Days	Increase in weight g
1459	B	Vitamin-freemargarine. 0.1 g per day.	13 (dead)	— 7		
1463	A		19 »	— 14		
1463	B		20 »	— 12		
1463	P		11 »	— 3		
1465	C		17 »	— 27		
1465	D		14 »	— 29		
1465	P		15 »	— 30		
1523	B	Arachis oil + $\beta$ -carotene. 0.05 g, containing 0.525 $\gamma$ $\beta$ -carotene, given per day.	21	31	35	50
1523	P		21	16	35	35
1525	D		21	17	35	41
1525	E		21	46	35	69
1525	F		21	39	35	60
1525	G		21	32	35	57
1525	P		21	38	35	66
1532	A		21	33	35	60
1532	B		21	30	35	58
1532	P		21	40	35	55
1532	R		21	21	35	36
				M. 31.2		M. 53.4
1523	C	Vitamin-freemargarine + $\beta$ -carotene. 0.05 g, containing 0.525 $\gamma$ $\beta$ - carotene, given per day.	21	28	35	52
1523	D		21	23	35	45
1523	O		21	14	35	40
1523	R		21	21	35	34
1525	A		21	25	35	62
1525	B		21	45	35	62
1525	C		21	49	35	58
1525	O		21	35	35	51
1532	C		21	30	35	55
1532	E		21	27	35	62
1532	O		21	26	35	44
				M. 29.4		M. 51.4
1459	R	Arachis oil + $\beta$ -carotene. 0.1 g, containing 1.05 $\gamma$ $\beta$ - carotene, given per day.	21	28	35	49
1463	R		21	39	35	54
1463	S		21	34	35	49
1464	B		21	49	35	74
1464	C		21	46	35	62
1464	O		21	32	35	44
1465	S		21	40	35	59
1504	E		21	51	35	90
1504	G		21	57	35	91
				M. 41.8		M. 63.6
1459	D	Vitamin-freemargarine + $\beta$ -carotene. 0.1 g, containing 1.05 $\gamma$ $\beta$ -carotene, given per day.	21	49	35	73
1459	T		21	41	35	62
1463	C		21	48	35	71
1463	O		21	37	35	48
1463	U		21	41	35	64
1464	P		21	43	35	60
1465	O		21	47	35	66
1504	A		21	46	35	75
1504	F		21	54	35	90
				M. 45.1		M. 67.7

## Results.

As is seen from the table<sup>1</sup> the margarine preparation used as a solvent for  $\beta$ -carotene is to be considered devoid of vitamin A-activity. From the data given it is further evident that no significant difference in rat growth promoting capacity exists between  $\beta$ -carotene dissolved in arachis oil and in margarine. Within the experimental error of the method the mean increases in weight are equal at both levels of the preparations tested.

The outcome of these experiments produces strong evidence in favour of the view that  $\beta$ -carotene is in fact well utilized from margarine. This result is naturally not directly comparable with that of BOMSKOV and RUF owing to a different margarine preparation being used here; it should however be noted that the above authors investigated three different types of margarine with practically the same result.

The evidence presented here applies primarily only to rats, but there is no special reason for the belief that the conditions should appear to be essentially different in humans.

## References.

- BOMSKOV, C., and F. RUF: *Klin. Wochenschr.* 1940. 19. 647.  
DYER, F. J., K. M. KEY and K. H. COWARD: *Biochem. J.* 1934. 28. 875.

---

<sup>1</sup> In the table the rat numbers consist of a figure signifying the number of the litter and a letter denoting the number of the rat within the litter. The first letters of the alphabet indicate males, the letters from O and so on females.

## Properties of Thrombokinase (Thromboplastin) from Ox Lung.

By

TAGE ASTRUP and SVEN DARLING.

(Received 6 October 1941.)

---

The properties and the composition of the coagulation-inducing tissue factor and its rôle in the blood clotting mechanism has been a puzzling and still unsolved problem in the history of blood coagulation.

Numerous experiments concerning this substance have been carried out, but its nature still remains obscure. The only thing which has been settled during the last 30 years is that its activity is due to a compound of protein and lipoid elements. The elucidation of the question has not been furthered by the employment of different names for the same substance as done by various authors, e. g. zymoplastic substance (ALEXANDER SCHMIDT) thromboplastin (HOWELL), tissue fibrinogen (WOOLDRIDGE, MILLS), cytozym (FULD and SPIRO, BORDET), thrombokinase (MORAWITZ), tissue coagulin (L. LOEB), thrombozyme (NOLF), and thrombokinin (LENGGENHAGER).

The earlier investigations have been discussed in reviews by HOWELL (1935), MORAWITZ (1905) OPPENHEIMER (1926, 1936) and WÖHLISCH (1928, 1940). The tissue factor has become of considerable importance in the recent years as it is now used in the clinic for determination of the prothrombin content in the blood. It is well known that this content is decreased in certain pathological conditions, for inst. K-avitaminosis (cf. DAM & GLAVIND (1938), THORDARSON (1941)).

In our studies on the different factors in the blood coagulation mechanism we have also investigated the tissue factor. We confirmed the experiences of earlier investigators, according to which the tissue factor is an unstable substance which cannot be purified by the usual methods. In this work experiments

with the tissue factor from ox lung is to be described. In the following this factor is designated as thrombokinase, without putting into this term any suggestion about its mode of action in the clotting process.

As mentioned, thrombokinase is known to consist of a lipoid component combined with a protein component. While the protein component has not yet been investigated separately, it has been the purpose of several investigations to isolate the lipoid component in pure condition. Especially HOWELL and his pupils have stated that it should be pure cephalin. Later investigations by FISCHER and HECHT (1934) and CHARLES, FISHER and SCOTT (1937) have shown, however, that the potency decreases by increasing purity of the cephalin.

Concerning the mode of action, it is now agreed by the different investigators that thrombokinase converts the proenzyme: prothrombin, into the blood-clotting enzyme: thrombin. The mechanism of this activation is still an open question. Some earlier workers have claimed that thrombokinase directly converted fibrinogen into fibrin, cf. (MILLS (1921) and MILLS and GUEST (1921)).

This later view is now definitely abandoned, however, especially after the recent investigations by SMITH, WARNER and BRINKHOUS (1934) and QUICK (1935). The thrombin formed does not contain the thrombokinase as an integrate part, as it is not possible to show the presence of phosphorus in the purest thrombin preparations (cf. ASTRUP and DARLING (1941)).

Thrombokinase is found in all tissues but in the largest amount in lung tissues. This has been shown by several authors (MILLS (1919), SMITH, WARNER and BRINKHOUS (1934) and FISCHER (1935 b)). HORNEFFER (1908) seems to be the first to make comparative studies on the thrombokinase content of different tissues.

## 1. Measurement of the Potency.

As a measure for the potency of a thrombokinase solution the clotting time is used. The relation between the clotting time and the amount of thrombokinase added to the plasma has often been investigated. Thus FULD (1902) and FISCHER (1935 a) have investigated the clotting of avian plasma by addition of avian thrombokinase. For this relation FISCHER (1935 a) has found the following equation (1) to exist:

$$\frac{1}{t} = k \cdot c^a, \dots \dots \dots (1)$$

in which  $t$  is the clotting time,  $c$  the amount of thrombokinase added and  $k$  and  $a$  constants.

This equation has been found by BARRATT (1934) and KUGELMASS (1923) also to be valid for the clotting of citrated and oxalated mammalian plasma with thrombin. In the present connection it is of greater importance that MILLS (1921) for the clotting of recalcified, oxalated plasma by addition of thrombokinase has used a logarithmic formula which can be derived from equation (1). This equation thus has a wide range of validity. It must be mentioned that the equation is purely empirical and says nothing about the reaction mechanism of the clotting.

A condition for using equation (1) for the determination of the potency of the thrombokinase is that the value of  $a$  is constant throughout the experimental series. It has been shown before (ASTRUP (1938)) that the value of  $a$  is characteristic for the reacting system and only depends on the experimental conditions, but neither on the amount of the active substance added nor on the units used in the measuring.

A further condition is that the amount of thrombokinase must not be too large. In such cases the so-called "prothrombin time" is obtained. This clotting time cannot be lowered by adding more thrombokinase.

The plasma contains a slight amount of thrombokinase arising from the platelets and from the injured tissue. By using avian plasma, which is stable without addition of anti-coagulants, it is not necessary to take this amount into consideration. If mammalian plasma is employed, the amount of thrombokinase is so considerable that it is necessary to use anticoagulants to prevent the spontaneous clotting. By recalcifying oxalated ox plasma a clotting time of 3—4 min. is as a rule obtained, and it is not impossible that the amount of thrombokinase giving such a clotting time may not be negligible in proportion to the amounts added. MILLS (1921) already was aware of this problem and tried to take it into consideration, correlating the clotting time observed with the clotting time of the recalcified plasma, without any addition of thrombokinase. This is not correct, however, as the original thrombokinase in the plasma must act as an addition to the amount of thrombokinase added and thus enter into equation (1) as an addition to the amount  $c$ . It is not possible, however, to obtain a simple relation, when the amount of thrombokinase in the plasma thus is taken into consideration. It is therefore fortunate that the following investi-

gations show that the value for  $a$  in the equation (1) is such that even the amounts of thrombokinase giving clotting times from 2—3 min. are small in proportion to the amounts added. It is therefore unnecessary also on employment of recalcified mammalian plasma to take the amounts of thrombokinase in the plasma into consideration.

In the calculations equation (1) is used in the following logarithmic form in which  $\log k = b$ .

$$\log t = -a \log c - b \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (2)$$

For the determination of  $a$  at least two measurements with different amounts of kinase is necessary, as  $b$  in equation (2) is to be eliminated. For the clotting times  $t_1$  and  $t_2$  corresponding to the amounts  $c_1$  and  $c_2$  the following equation is derived.

$$\log \frac{t_2}{t_1} = a \cdot \log \frac{c_1}{c_2} \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (3)$$

In equation (3)  $a$  can be determined from measurements of two known concentrations of thrombokinase. When  $a$  is known the equation can be used to determine an unknown amount  $c_1$  of thrombokinase in proportion to a known concentration  $c_2$ .

More reliable results are obtained by using series of dilutions of the kinase investigated and to draw a curve with  $\log c$  as abscissa and  $\log t$  as ordinate. A straight line is obtained from which  $a$  is determined, as  $-a$  is the slope. From this curve unknown concentrations can be determined. For the purpose of comparing the strength of different kinase solutions a unit for thrombokinase action is chosen. A priori it seems rather doubtful that a thrombokinase unit based on the clotting of recalcified oxalated plasma is a constant figure, as in the clotting time enter both the conversion of prothrombin to thrombin, the action of thrombin on fibrinogen and the formation of a clot by means of the insoluble fibrin. In all these reactions the influence of unknown factors can take place. The results are fairly constant, however, when fresh plasma is used. This must be due to the constancy of the prothrombin concentration and the fibrinogen concentration in the blood, but also other unknown circumstances must vary between rather narrow limits. It has to be mentioned, however, that by using kinase preparations from other tissues  $a$  can show different values.

The ox plasma used in these investigations is obtained as before (ASTRUP and DARLING (1941)) from ox blood containing 0.3 per cent of potassium oxalate. The thrombokinase is prepared as follows (compare SEEGER, BRINKHOUS, SMITH and WARNER (1938)).

### Crude Thrombokinase (K—I).

4 kg of fresh ox lung is washed with water and ground in a meat chopper. The pulp is then extracted 24 hours with 4 l of 0.9 per cent sodium chloride solution. 5 ml of 90 per cent phenol dissolved in a little water is added. After standing it is passed through a layer of gauze and the filtrate is centrifuged. This gives about 2.5 l of thrombokinase solution.

### Purified Thrombokinase (K—II).

2.5 l of crude thrombokinase (K—I) is diluted with 25 l of distilled water, and 500 ml of 1 per cent solution of acetic acid are added. The precipitate is centrifuged, washed with distilled water and centrifuged again. It is then squeezed through gauze into 750 ml of physiol. NaCl, and to the suspension is added 1-n NaOH drop by drop until pH about 10 (British Drug House Universal Indicator). By this procedure a fine emulsion is formed which is then changed to pH = 7.3 by adding 1-n acetic acid (indicator color: yellow green). The resulting solution is heated in a water bath to 40° C for an hour whereby the potency is increased 3 times.

## 2. The Measurement.

For measuring the activity, tubes of 80 × 15 mm and a water bath at 37° C are used as in the determination of the potency of thrombin (ASTRUP and DARLING (1941)).

First the optimum amount of calcium chloride for recalcification is determined. In a series of clotting tubes 0.10 ml of a thrombokinase solution is pipetted off and varying amounts of a 1.5 per cent solution of  $\text{CaCl}_2$ , *sicc.* are added. The amounts vary between 0.20 and 0.35 ml. Then 1.0 ml of oxalated plasma is added and the clotting time determined. The resulting optimum concentration of calcium chloride is then used in the following determinations. Usually the amount is 0.25—0.30 ml.

A series of dilutions of the thrombokinase solution in the proportions 1,  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$  etc. is prepared. In the clotting tubes 0.10 ml. of the different solutions is pipetted off, and then the optimum amount of calcium chloride is added. After addition of 1.0 ml of oxalated plasma the clotting time is determined. In

this paper the clotting time is measured in 0.01 min. Usually it is possible to measure the clotting time of 10 dilutions in the said proportion. Fig. 1 shows examples of such measurements.  $t$  is the clotting time, and  $c$  is the concentration of thrombokinase in per cent of the original solution. In this graph  $\log c$  is abscissa, and  $\log t$  is ordinate. For curve 1 the constant  $a$  is 0.200, and for curve 2  $a$  is 0.195. Curve 2 shows the phenomenon of the so-called "prothrombin time", the characteristic of which is, that the clotting time does not decrease further by increasing the amount of thrombokinase. The points in the curves are

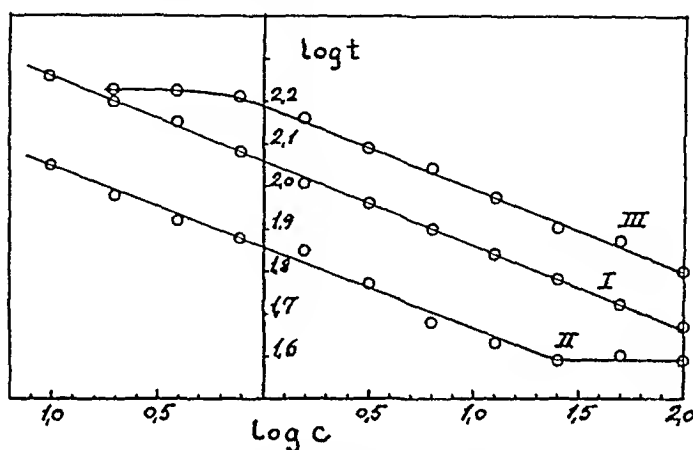


Fig. 1. Concentration of thrombokinase in logarithm of the percentage against logarithm of the clotting time.

the average values of three determinations. Under favourable conditions the deviation is  $\pm 4$  per cent on the determination of  $t$ . Curve 3 shows another phenomenon, namely deflection at the larger clotting times, i. e. by small additions of thrombokinase. This is due to the small amounts of thrombokinase present in the plasma which bring the plasma to clot on addition of calcium chloride alone, yielding the so-called "clotting time proper" of the plasma. When small amounts of kinase are added, the amount of thrombokinase in the plasma is no longer negligible.

Repeated determinations on different samples of kinase and plasma yield 26 dilution curves. The 24 of these curves lie between the limits  $a = 0.200 \pm 0.005$ , and only the two remaining curves have other values, i. e.,  $a = 0.185$  and  $a = 0.305$ .

The average value for  $a$  of the 24 curves is 0.200 and this value



is therefore valid for the clotting process under the existing experimental conditions. As further the value does not depend on the choice of unit for the concentration of thrombokinase or the measuring time (ASTRUP (1938)) the value  $a = 0.200$  can be employed for the calculation of a curve for the standardisation. As a unit for thrombokinase (k. u.), is chosen the amount of active substance which under the described conditions clot 1 ml of recalcified oxalated plasma in 1 min. In the equation (2)  $\tau$  then is 100;  $a = 0.200$  and  $c = 1$ ;  $b$  is thus found to be  $-2.000$ . If the measurements are carried out in seconds instead of 0.01

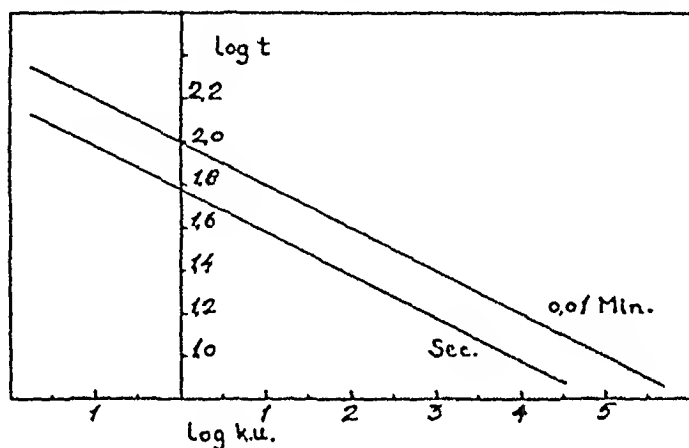


Fig. 2. Logarithm of number of thrombokinase units (k. u.) against logarithm of the clotting time.

min.,  $t = 60$  and  $b$  is found to be  $-1.7782$ . By substitution of these values in equation (2) the following two equations for the measurement is obtained. Equation (4) is used when the clotting time is determined in 0.01 min. and equation (5) when it is measured in seconds.

$$0.01 \text{ min: } \log c = 5 \cdot (2 - \log t) \quad . . . . . (4)$$

$$\text{sec: } \log c = 5 \cdot (1.7782 - \log t) \quad . . . . . (5)$$

Based on equations (4) and (5) the standardisation curves in Fig. 2 are drawn. From these curves it is possible to find the potency of the thrombokinase used in the experiments. The thrombokinase unit chosen is a rather small unit. If the clotting time for the unit was chosen as 0.5 min. instead of 1 min. it is found from equation (4) that this corresponds to 32 k. u.

Thus such a unit would be 32 times larger than the unit chosen. From this it is clearly seen, that there is a great difference between the measurement of the activity of thrombin and of the activity of thrombokinase, a fact which is due to the more complicated reaction mechanism acting in the determination of thrombokinase.

### 3. The Accuracy of the Measurement.

Due to the logarithmic form of the equation for the measurement it is not possible directly to judge about the accuracy with which the concentration of thrombokinase can be determined from the clotting time, as with the more simple measuring of thrombin. It is therefore necessary to carry out a special calculation of the standard deviation. From the equation (2) is derived the equation (6) for the deviation.

$$d \log t = -\log c \cdot d a - a \cdot d \log c \dots \dots \dots (6)$$

From this equation (7) is obtained.

$$\frac{\Delta c}{c} = \sqrt{\left(\frac{\Delta a}{a} \cdot \log c\right)^2 + \left(\frac{1}{a} \cdot \frac{\Delta t}{t}\right)^2} \dots \dots \dots (7)$$

In equation (7)  $a = 0.200$  and  $\Delta a$  is 0.005 just as before. The error  $\Delta t$  on the clotting time  $t$  can by careful determination in a favourable part of the curve be as low as  $\pm 4$  per cent. By substituting these values in equation (7) equation (8) is obtained.

$$\frac{\Delta c}{c} = \frac{1}{10} \sqrt{\frac{(\log c)^2}{16} + 4} \dots \dots \dots (8)$$

The clotting time varies between 0.20 and 3.00 min. corresponding, according to equation (4), respectively to 3.495 and — 2.3855 for  $\log c$ . The maximal numerical variation of  $\log c$  is then from 0 to 3.5. The first term under the square root in equation (8) then varies between 0 and 0.8. The error made in putting  $a$  equal to 0.200 in the determinations is therefore small in comparison with errors in the determination of the clotting time (expressed in the second term of the square root). The whole error varies between:

$$\frac{\Delta c}{c} = \frac{1}{5} = 20 \text{ per cent and } \frac{\Delta c}{c} = \frac{\sqrt{4.8}}{10} = \frac{2.2}{10} = 22 \text{ per cent.}$$

Due to the special course of the reaction, the errors in the determinations of the concentrations of active substance are rather large and are practically due only to the errors in the determinations of the clotting time. To a lesser degree it is due to the fixed standard equation. The determinations of the clotting time must therefore be carried out with the greatest possible accuracy. In carrying out the calculation of the inaccuracy an error of  $\pm 4$  per cent in the determination of  $t$  was reckoned with. This is a rather high accuracy, which may be obtained only under favourable conditions. In spite of this, the final result involves an error over 20 per cent.

For clotting times shorter than 0.35 min. and longer than 2.00 min. the error must be put at 10 per cent. In this case the error on the determination of the thrombokinase concentration amounts to 50 per cent.

This shows that the clotting of recalcified oxalated plasma is a rather unsuitable measure for the purpose, due to the logarithmic form of the relation, but so far no other convenient method has been available. It is further seen, that the employment of an amount of thrombokinase for expressing any reaction concerning the blood clotting is an unsatisfactory method.

Due to the large errors it is of no use to take the minimal amount of thrombokinase in the plasma itself into consideration. According to the definition, 1 thrombokinase unit (k. u.) corresponds to the clotting time of 1 min. A clotting time of 3 min. for the recalcified oxalated plasma itself, with no addition of thrombokinase, corresponds thus, according to equation (4), to 0.004 k. u.

It may be mentioned that it is the small value of  $a$  which gives rise to the main inaccuracy of the determination. If the value of  $a$  was higher and approaching 1, much better results could be obtained.

For determination of the potency of a thrombokinase solution, it is best to prepare a series of dilutions and to measure the clotting of each in the manner described. From these determinations an average value can then be calculated, so that the large error on the measurement of each single concentration may be reduced.

It was attempted to carry out the measurements on citrated instead of on oxalated plasma, but this gave more inconstant results.

#### 4. Heat Stability of Thrombokinase.

The stability against heating of the purified thrombokinase (K—II) was investigated. A series of tubes containing samples of the thrombokinase were placed in a water bath. After different periods of time one of the samples was placed into ice-water

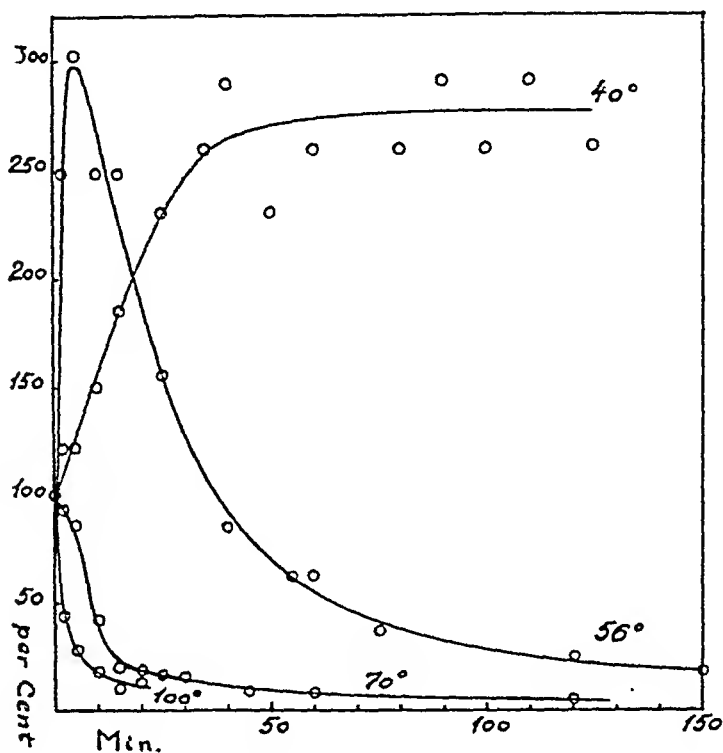


Fig. 3. Potency of heated thrombokinase in per cent of the original solution.

whereby the inactivation was stopped. The clotting time of the sample was then determined as usual and the potency calculated according to equation (4). The potency was then calculated in per cent of the potency of the original solution. The inactivation is investigated at the temperatures 100°, 70°, 56° and 40° and the results are shown in Fig. 3.

From the curves in Fig. 3 it is seen that by heating the fresh thrombokinase to a not too high temperature, a large increase in the potency results, up to about 300 per cent. This property was utilised in the preparation of the purified thrombokinase (K—II). Already at 56° an inactivating process is added to

this activating process, so that the increase of the potency after a few min.'s duration is changed to a decrease of the potency. At 70° the last named process is dominating. The cause of the increasing potency is not clear, but is probably due to a greater solubility of the active substance, probably by obtaining a higher degree of dispersion, as the thrombokinase solution is a rather coarsely dispersed system which, for inst., hardly stands a centrifugation or filtration, see later. Similar experiments were carried out with a crude thrombokinase (K—I), but there it was difficult to get reproducible results. The viscosity of the solution was very much increased by the heating, so that an accurate pipetting for the measurements became impossible; nevertheless moderate heating was found to increase the potency. Also the potency of chicken thrombokinase is increased by heating, FISCHER (1931).

### 5. Other Properties.

From 4 kg of lung a crude kinase (K—I) is prepared. A solution of 2.50 l is obtained which gives 0.75 l purified kinase (K—II). In these solutions the amount of nitrogen is determined together with the potency of the solutions and of the purified kinase heated to 40°. The results are shown in Table I.

Table I.

	t	k. u. per ml	mg N per ml	k. u. per mg N
K—I	55	199	3.92	51
K—II (unheated)	59	140	2.36	59
K—II (heated)	49	354	2.36	150

From Table I it is seen that no purification expressed in numbers of kinase units per mg of nitrogen has taken place in preparing the unheated kinase K—II from the unheated kinase K—I. By the heating process the potency is increased 3 times, but as it is also possible to increase the potency of K—I by heating, no calculation of the efficiency of the purification can be carried out. The purification of K—I is then to be looked upon, not as a concentration of active substances, but as replac-

ing some more disagrecable impurities (mucins and the like) by some less inconvenient impurities.

For a study of the filtration, the unheated K—II kinase is diluted 4 times with physiol. NaCl. The potency of the solution of the filtrate is determined as usual. The original solution gives the clotting time  $t = 77$  which corresponds to 37 k. u. per ml. For the filtrate is obtained  $t = 117$  which gives 5 k. u. per ml. By the filtration then about 87 per cent of active substance is lost.

In the same manner the influence of centrifugation on the potency is investigated. The unheated K—II contains 140 k. u. per ml. After a centrifugation for 5 min. at 3,500 revolutions per min. the potency of the solution is reduced to 35 k. u. per ml. The loss is about 75 per cent. By shaking the solution with the precipitate 140 k. u. per ml is again obtained. The active substance in this thrombokinese preparation is thus mainly bound to particles which are so large that they do not pass through a common filter paper and do not stand centrifugation.

According to MILLS (1921) the thrombokinese is precipitated by half saturation with ammonium sulphate, therefore 200 ml of an unheated kinase K—II is precipitated with 200 ml of saturated ammonium sulfate solution. The precipitate is isolated and dissolved in physiol. NaCl and then dialysed. After dialysis it is diluted to 200 ml, and the potency is determined to 5 k. u. per ml against 140 k. u. per ml in the original solution. The loss has been about 97 per cent. The mother liquor from the ammonium sulphate precipitation is then saturated with solid ammonium sulphate. There results only a small amount of precipitate with no activity. According to MILLS (1921), the thrombokinese thus belongs to the globulins.

On precipitation of a kinase solution with acetone the activity is totally lost. This applies not only to the acetone-dried precipitate but also to the fresh precipitated substance redissolved in physiol. NaCl.

Evaporation in a thin layer in a vacuum desiccator containing sulphuric acid and NaOH gives a practically inactive substance, which is not in accordance with the experiments of BARTELLI (1910).

By drying fresh ground lung at about 40° in an air stream, the activity is not wholly lost. The dry product weights about 20 per cent of the crude lung. 100 g of such a product is extract-

ed with 900 ml of 0.45 per cent NaCl. The clotting time is 58 which gives 152 k. u. per ml. The solution contains 4.22 mg N per ml. The activity is then 36 k. u. per ml of N. By extracting a corresponding amount of fresh lung tissue the solution contains 542 k. u. per ml. The yield is then about 15 per cent. In some preparations the activity had been almost totally lost so the process is subjected to unknown accidental influences.

Corresponding to the experiences of other authors, thrombokinase is thus a very unstable substance and difficult to purify. It seems to belong to the globulins and to be very sensitive to denaturing influences, which is possibly due to the lipid component of the thrombokinase complex.

### Summary.

1. Extracts containing the tissue factor active in clotting (thrombokinase, thromboplastin) from ox lung have been prepared and investigated.

2. An equation for expressing their strength has been found. A thrombokinase unit (k. u.) is defined. The method of measuring, its difficulties and its accuracy are discussed.

3. The heat lability has been studied. Heating to 40° increases the strength 3 times. Temperatures higher than 56° inactivates the solutions. Other properties are mentioned. The thrombokinase shows globulin character and is very readily denatured.

Thanks are due to "Danmarks tekniske Højskoles Fond for teknisk Kemi" and to "Løvens kemiske Fabrik", Copenhagen, for grants in aid of this work.

### References.

- ASTRUP, T.: *Enzymologia* 1938, 5, 119.  
ASTRUP, T. and S. DARLING: *Acta Physiol. Scand.* 1941, 2, 22.  
BARRATT, J. O. W.: *J. Physiol.* 1934, 80, 422.  
BATTELLI, F.: *C. R. Soc. Biol., Paris* 1910, 68, 789.  
CHARLES, A. F., A. M. FISHER and D. A. SCOTT: *Trans. Roy. Soc. Can.* 3. Ser. Sec. 5. 1937, 28, 49.  
DAM, H. and J. GLAVIND: *Acta Med. Scand.* 1938, 96, 108.  
FISCHER, A.: *Biochem. Z.* 1931, 240, 357.  
FISCHER, A.: *Ibidem* 1935 a, 278, 320.

- FISCHER, A.: Ibidem 1935 b, 278, 334.  
 FISCHER, A. and E. HECHT: Ibidem 1934, 269, 115.  
 FULD, E.: Hofmeisters Beiträge chem Physiol. 1902, 2, 514.  
 HORNEFFER, C.: Thesis, Geneve, 1908.  
 HOWELL, W. H.: Physiol. Rev. 1935, 15, 435.  
 KUGELMASS, I. N.: Arch. int. Physiol. 1923, 21, 139.  
 MILLS, C. A.: J. Biol. Chem. 1919, 40, 425.  
 MILLS, C. A.: Ibidem 1931, 46, 135, 167.  
 MILLS, C. A. and G. M. GUEST: Amer. J. Physiol. 1921, 57, 395.  
 MORAWITZ, P.: Ergebn. Physiol. 1905, 4, 307.  
 OPPENHEIMER, C.: Die Fermente, Hauptwerk 1926 and Supplement 1936.  
 QUICK, A. J.: Amer. J. Physiol. 1935, 114, 282.  
 SEEGER, W. H., K. M. BRINKHOUS, H. P. SMITH and E. D. WARNER: J. Biol. Chem. 1938, 126, 91.  
 SMITH, H. P., E. D. WARNER and K. M. BRINKHOUS: Amer. J. Physiol. 1934, 107, 63.  
 THORDARSON, O.: Undersøgelser over prothrombin hos sunde og syge. (Copenhagen), Aarhus 1941.  
 WÖHLISCH, E.: Ergebn. Physiol. 1929, 28, 443.  
 WÖHLISCH, E.: Ergebn. Physiol. 1940, 43, 174.



# **The Effect of Narcotics, Especially Barbiturates, on Salivary Secretion, Elicited through Chorda Stimulation or Parasympatho- mimethic Drugs.**

By

N. S. BRÄHAMMAR and N. G. EMMELIN.

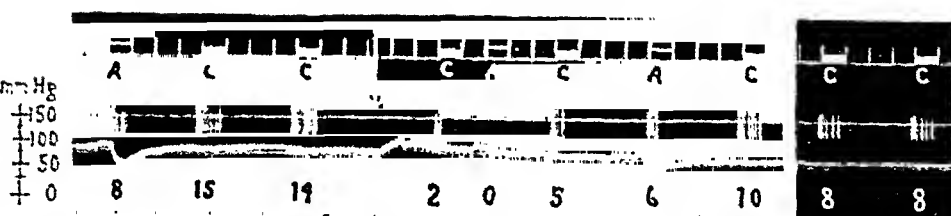
(Received 20 October 1941.)

---

LOEWI (1912) found in experiments on rabbits that administration of chloral hydrate augmented the inhibitory effect of vagus stimulation. Since that time many experiments have been made, the results of which show that indifferent narcotics influence the effects, elicited through stimulation of parasympathetic nerves (see further MORAËUS 1936 and TATUM 1939). Most of these experiments have been performed on muscular organs (heart, intestine and uterus). Only a few observations have been made on glands under cholinergic control. STAVRAKY (1931) showed that administration of amytal (isoamylethylbarbituric acid) induced a decrease in the salivary secretion, elicited by stimulation of the chorda. We have shown in a previous paper (1941) that evipan (N-methylcyclohexenyl methyl barbituric acid) also diminishes the salivary secretion, elicited by stimulation of the chorda, and that it further lessens the sweat secretion from the cat's toepads, brought about through stimulation of the sciatic nerve.

## **Experimental.**

The experiments were performed on cats under chloralose and artificial respiration. A cannula was inserted in the submaxillary duct on one side and connected with an electrical drop recorder.



The tracing shows from above downwards: time in minutes, rate of secretion, blood pressure. The figures refer to the number of drops obtained. A: injection of 5% acetylcholine; C: stimulation of the chorda during 1 minute. At ↓ 75 mg/kg body weight veronal was administered intravenously. Between the two sections of the tracing is an interval of 20 minutes.

The lingual nerve was exposed proximally to the chorda tympani, placed in a stimulating electrode, which was attached to the secondary coil of an inductorium, and cut centrally to the electrode. Acetylcholine was injected through a fine needle in the carotid artery, the blood flow of which was not interfered with. In some experiments carbaminoylcholine or pilocarpin was injected at a constant rate in a femoral vein. In this latter type of experiments, where the gland was stimulated during a longer period, FLEISCH's 'pulse time recorder' (1930) was used as a drop recorder. The blood pressure in the carotid artery was registered by means of a membrane manometer. The narcotics were administered intravenously. The following drugs were investigated: veronal (diethylbarbituric acid), luminal (phenylethylbarbituric acid), dial (diallylbarbituric acid), prominal (N-methylphenyl ethyl barbituric acid), noctal (isopropyl brompropenyl barbituric acid) eunareon (N-methylisopropyl bromallyl barbituric acid), chloral hydrate and urethane.

The figure shows the effect of veronal, which diminishes the secretory response to chorda stimulation or to acetylcholine. The inhibitory effect is transitory, but still marked 40 minutes after the administration of veronal. The curve also indicates that the diminished salivary secretion cannot be due to a reduced filtration pressure, as the injection of veronal was not followed by a fall in blood pressure.

All the investigated barbiturates had a similar effect. The table below shows the doses which exerted a marked inhibitory effect on the salivary secretion.

Drug	Dose	Duration of inhibition
Veronal sodium . . . . .	75 mg/kg	> 1 hour
Luminal sodium . . . . .	50 "	> " "
Prominal sodium . . . . .	5 "	ca. 30 min.
Dial sodium . . . . .	50 "	" " "
Noctal sodium . . . . .	30 "	" 20 "
Eunareon sodium . . . . .	5 "	" 10 "

It can further be seen from the table that the N-methylated compounds (prominal and eunarcon) are effective in considerably smaller doses than the corresponding not N-methylated drugs (luminal and noctal). A similar relation between these groups of compounds was also observed in experiments on their atropinelike effects on the frog's heart (EMMELIN 1941).

The investigated barbiturates diminished also the salivary secretion elicited through carbaminoylcholine or pilocarpin.

Experiments were also performed with urethane and chloral hydrate. The results were however not uniform. In some cases these compounds augmented the salivary secretion, in others no changes could be observed.

### Comment.

The experiments described above show that the choice of narcotic has a certain importance in investigations of the salivary secretion in anaesthetized animals. It may be of practical interest that e. g. eunarcon, which is used as a surgical narcotic, reduces the salivary secretion contrary to volatile anaesthetics as ether and chloroform, which augment the salivation (proved experimentally by e. g. ROBBINS 1935). It may be possible to make use of the inhibitory effect of barbiturates on salivary secretion therapeutically in cases of ptyalism of different origin, as e. g. in mercurial intoxication and in some organic nerve diseases.

### Summary.

Veronal, luminal, prominal, dial, noctal and eunarcon diminish the salivary secretion, elicited through stimulation of the chorda tympani or through injections of acetylcholine, carbaminoylcholine or pilocarpin.

### References.

- EMMELIN, N.: *Acta physiol. scand.* 1941, 2, 289.  
FLEISCH, A.: *Z. ges. exp. Med.* 1930, 72, 384.  
LOEWI, O.: *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 1912, 70, 323.  
MORAEUS, B.: *Upsala Läk. för. Förh.* 1936, 42, 209.  
ROBBINS, B. H.: *J. Pharmacol.* 1935, 54, 426.  
STAVRAKY, G. W.: *Ibidem* 1931, 43, 499.  
TATUM, A. L.: *Physiol. Rev.* 1939, 19, 472.
-

From the Women's Clinic, University, Lund (Prof. A. WESTMAN),  
and the Women's Clinic, General Hospital, Malmö (Dr. S. GENELL),  
Sweden.

## Studies on the Muscular Physiology of the Genital Tract.

### III. Tonus, Spontaneous Activity and Drug Reactions in the Vaginal Muscles.

By

SUNE GENELL.

(Received 27 October 1941.)

---

Our knowledge of the physiology of the vaginal musculature rests mainly on the works of WADDELL (1917), GUNN and DAVIES (1920), and GUNN and FRANKLIN (1922). From these it is evident that both surviving vaginal muscle and the vagina in situ, in all animals examined, including man, possess the property of spontaneous rhythm and that the vaginal musculature is always positively adrenotropic irrespective of whether the uterine muscle of the animal in question reacts positively or negatively to adrenaline.

The action of the sex hormones on the functional conditions of vaginal muscle has received very scanty attention. There is only the finding of TEMPLETON, STEIN and SCHOCHET (1931) made in balloon recording investigations on the vaginal motility in women, viz. that the spontaneous rhythmic contractions always registrable in the fertile age cease in the menopause. The rhythmic contractions in the vagina occur during all periods of the sexual cycle, but are more marked during the week after menstruation (the period of follicular maturation).

The present investigation, which aims at adding to our knowledge of the physiology of the vaginal muscular apparatus, has been carried out on *rats*. The spontaneous activity and drug reaction

experiments have been conducted on surviving material. In addition some observations have been made on living animals with regard to the tonus conditions of the vagina.

*Method.* 78 animals have been employed, distributed over the different sexual phases as well as over the groups castrates and oestrin-treated castrates. After it had been ascertained that the circular and longitudinal muscles of the vagina behave alike, longitudinal muscle preparations were chiefly employed. These were prepared as follows. After the vagina had been clipped free from the cervix in the fornices, the paravaginal connective tissue including any accompanying striated pelvic-floor muscle and urethra was dissected away. At the vulva the clitorium and the surrounding vulvar margin itself were left; all hair-covered skin was removed. The threads for recording were arranged as sutures, the upper one through both vaginal walls at the edge of the fornix, the lower one through the base of the clitorium and posterior vulvar margin.

The usual dispositions for the Magnus-Kehrer experiment were adopted. Medium 100 ml saline: NaCl 8, KCl 0.42, CaCl<sub>2</sub> 0.24, MgCl<sub>2</sub> 0.005, NaHCO<sub>3</sub> 1, glucose 0.5 per 1,000 ml. Oxygen with 5 % CO<sub>2</sub> was bubbled through this. The recording enlargement effected by the pen-stroke was 1:7.

Of the experiments, eight (Figs 1—8) are reported in full. The results of all the experiments carried out are recorded in Table 1 with respect to the contraction frequency, amplitude and response to adrenaline, negative quality being denoted by o, positive quality by +, ++, +, or ++.

*Spontaneous Activity.* As can be seen from Table 1, the surviving vagina develops spontaneous activity only exceptionally. This applies more especially to the pro-oestrous phase (Fig. 1 lower, 4 lower), oestrous phase (Fig. 1 upper, 2 upper), and the di-oestrous phase (Fig. 3). In the metoestrous phase (Fig. 2 lower, 4 upper) more than half the experiments show a more or less pronounced spontaneous activity. The contraction frequency is low in pro-oestrus, oestrus and di-oestrus in the exceptional cases exhibiting spontaneous activity, in metoestrus it is in all cases higher. The amplitude is insignificant in pro-oestrus, oestrus, and di-oestrus, in metoestrus it is somewhat greater.

Vagina from *castrated animals* (Figs. 5, 6) without exception shows a lively spontaneous activity, as is evident from the table. The contraction frequency is greater throughout than in the normal sexual phases, likewise the amplitude. In *oestrin-treated castrates* this spontaneous activity ceases (Fig. 7) or diminishes considerably.

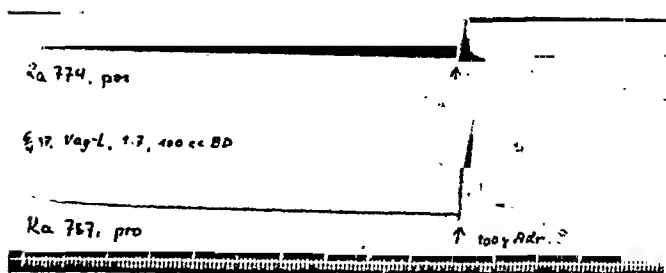


Fig. 1. Upper curve: oestrus; lower curve: pro-oestrus. Addition:  $100\mu\text{g}$  adrenaline. Bath 100 ml. Pen-stroke ratio 1:4.7. Time in min.

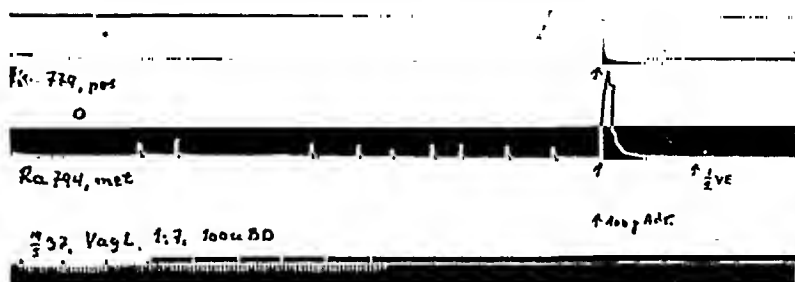


Fig. 2. Upper curve: oestrus; lower curve: metoestrus. Addition:  $100\mu\text{g}$  adrenaline, 0.5. unit pitocin. Bath 100 ml. Pen-stroke ratio 1:7. Time in min.

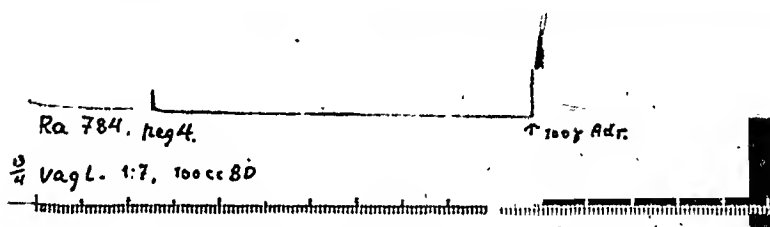


Fig. 3. Di-oestrus. Addition  $100\mu\text{g}$  adrenaline. Bath 100 ml. Pen-stroke ratio 1:7. Time in min.

*Adrenaline Reaction.* As it was found that maximum contraction of the vaginal preparation was first obtained with a dose of  $100\mu\text{g}$  per 100 ml of saline solution, this dose was given in all the experiments. (Adrenaline, P. D., was employed, addition 0.1 ml of the original preparation =  $100\mu\text{g}$ .) Table 1 shows that surviving vagina from animals in normal sexual cycle is always positively adrenotropic (See Figs 1, 2, 3). The response to adrenaline is an instantaneous and violent contraction. The relaxation takes place slowly in stages; at times there is no return to the original state of tonus. The amplitude of the maximum

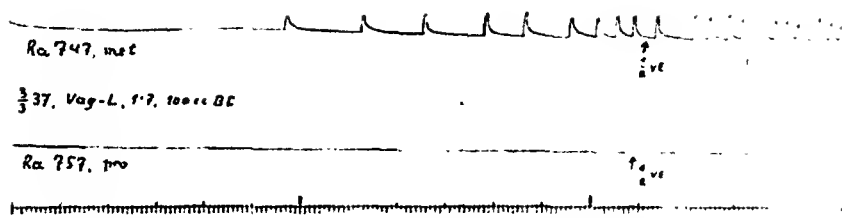


Fig. 4. Upper curve: metoestrus; lower curve: pro-oestrus. Addition 0.5 unit pitocin. Bath 100 ml. Pen-stroke ratio 1.7. Time in min.

Table 1.

The figures indicate the number of experiments in which the respective manifestation of function of the vagina was observed in the stated quality.

P h a s e (No. of exp.)	Contraction frequency					Spontaneous amplitude					Amplitude after 100 µg of adrenaline					Total
	0	+	++	+	++	0	+	++	+	++	0	+	++	+	++	
Pro-oestrus (14) . . .	11	2	1			11	3					5	6			11
Oestrus (13) . . . .	10	2	1			10	3					2	8	1		11
Metoestrus (15) . . .	6	4	3	2		6	3	4	2				6	6		12
Di-oestrus (8) . . . .	7		1			7		1				1	1	3		5
Castrate (8) . . . .		1	7	5			1	5	6	1	12					12
Oestrin-treated castrates (7) . . . .	3	1	1	2		3	3	1				3	2	2		

contraction is consistently greatest in metoestrus, less in other phases, least in pro-oestrus.

After *castration* the positive adrenaline reaction changes to negative (Table 1 and Fig. 5). The spontaneous activity developed by the surviving vagina of castrates is inhibited by adrenaline for some time, but always returns again.

The negative adrenaline reaction of the castrate vagina can be changed to positive if the animal is pre-treated with oestrin (see Table 1 and Fig. 7). Whether the spontaneous activity has been wholly or partly arrested by oestrin treatment, vagina from oestrin-treated castrates responds without exception by contraction.

*Oxytocic Reaction.* The response of vaginal muscle to oxytocin has only been studied in a small number of experiments. The

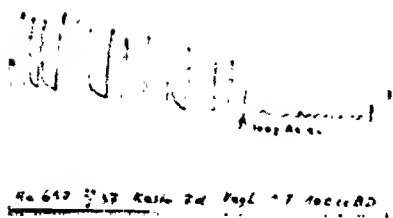


Fig. 5. Castrate (since 7 days). Addition: 100  $\mu$ g adrenaline. Bath 100 ml. Pen-stroke ratio 1:7. Time in min.

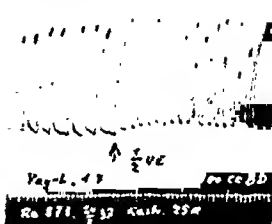


Fig. 6. Castrate (since 25 days). Addition: 0.5 unit pitocin. Bath 100 ml. Pen-stroke ratio 1:7. Time in min.

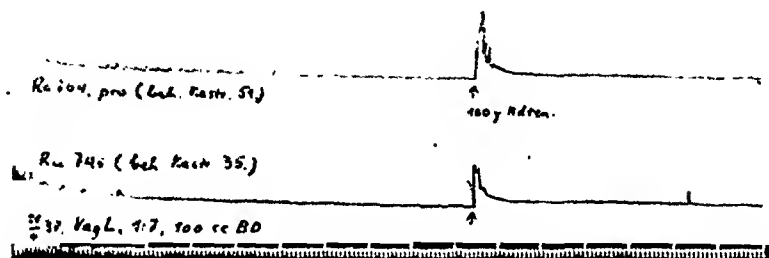


Fig. 7. Upper curve: castrate (since 51 days) treated with oestrin; lower curve: castrate (since 35 days) treated with oestrin. Addition: 100  $\mu$ g adrenaline. Bath 100 ml. Pen-stroke ratio 1:7. Time in min.

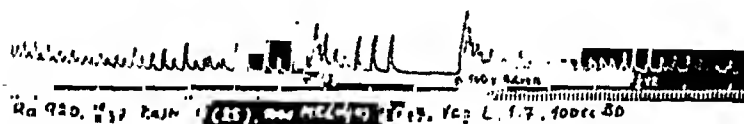


Fig. 8. Castrate (since 25 days), treated with 1,000 M. U. oestrin two days before experiment. Additions: 10  $\mu$ g adrenaline, 100  $\mu$ g adrenaline, 0.5 unit pitocin. Bath 100 ml. Pen-stroke ratio 1:7. Time in min.

muscle of vagina from animals with a normal sex cycle is always refractory to oxytocin (Fig. 4). The spontaneously active vaginal muscle from castrates (Fig. 6) reacts to oxytocin by increase of tonus and increase of contraction frequency. This effect is inhibited if the castrated animal is pre-treated with oestrin (Fig. 8).

*Discussion.* On the basis of previous investigations it has been considered that spontaneous rhythm is always shown by the surviving vagina from all the animals examined. The present investigation shows that this is not the case in the rat. Spontaneous activity seems to be an inherent property of the vaginal musculature of castrates. In animals with functioning ovaries spontaneous activity occurs only exceptionally in the vagina and is then weak, with low contraction frequency and small amplitude.



In the metoestrous phase, when oestrin increment is lowest, the vagina more frequently develops spontaneous activity, of greater contraction frequency and amplitude than in the other sexual phases.

For this reason it appears probable that the inhibition of the spontaneous activity of the vaginal musculature is effected by the oestrin. This conclusion may be considered to be proved by the observation that the spontaneous activity of the castrate vagina is partly or wholly arrested if the castrated animal is pre-treated with oestrin.

According to GUNN and his associates the vaginal muscular apparatus of the rat is positively adrenotropic. According to my investigation this applies only to vagina from animals with a normal sexual cycle. There is a change to negative in the adrenaline response after castration. The negatively adrenotropic castrate vagina may be turned into positively adrenotropic by pre-oestrinization of the castrated animal. The heat hormone, oestrin, is accordingly responsible for the nature of the adrenaline reaction in the vaginal musculature of the fertile animal.

The adrenaline dose employed in the experiments gives a maximum contraction. The amplitude of the adrenaline contraction is uniformly narrower in the sexual phases most strongly affected by oestrin, especially pro-oestrus. Since oestrin, as shown, is responsible for the positive adrenaline reaction in the vaginal muscles, it does not appear reasonable to suppose that these differences in the size of the amplitude are due to a lower adrenaline sensitivity. The probable explanation of the narrow amplitude in the oestrous phase is that the vaginal musculature is then in a state of *higher tonus*.

This explanation is corroborated by the following observations on the living, unaesthetized animal. On taking vaginal smears the vulva is always found less open in the heat phase, the lumen of the vagina less accessible to the instrument on account of considerable folding. The vagina is shallow, and the platinum loop is apt to come up against the portio. The same condition is noticed on examination by speculum of the vagina in the heat phase. Contrasting with this are the conditions during the non-heat phase and in castrates. The vulva is then open, the vagina wider, fold formation less pronounced, the vaginal canal deeper. In oestrin-treated castrates the conditions are altered to those typical of the heat phase.

These observations have been made during several years on over 1,000 animals from which vaginal smears were made daily for at least three weeks, often for several months. It seems justifiable to infer, even without objective recording (for which it has not been possible to evolve any serviceable method), that the *tonus of the vaginal musculature is high during the heat phase, low during the non-heat phase and in castrates, and that these variations in tonus are due to the oestrin.*

The oxytocic reaction of the vaginal musculature has not been previously investigated. From my experiments it appears that the vaginal musculature of animals in a fertile condition is refractory to oxytocin, whereas the vagina of castrates gives a typical oxytocic reaction. The positive response given by the castrate vagina to oxytocin is inhibited by pre-treatment of the castrate animal with oestrin. Thus, the heat hormone, oestrin, is responsible for the inhibition of the oxytocic reaction in the vaginal muscular apparatus of the fertile animal.

As regards the spontaneous activity of the vaginal musculature *in vitro*, the same applies as I have shown in an earlier investigation (GENELL, 1939) in regard to the uterine musculature: it probably consists for the most part of pendular movements elicited by the loading, and in all probability does not occur or does so only to a trifling extent *in vivo*. The generally established physiological agreement between adrenaline effect *in vitro* and *in vivo* and between adrenaline effect and nerve-stimulation effect would seem to justify the assumption that the results reported here of the adrenaline experiments on surviving vagina are in principle likewise applicable *in vivo*.

### Summary.

Surviving vagina from rats with a normal sexual cycle often exhibits a moderate degree of spontaneous activity in metoestrus. In the other sexual phases this activity occurs only exceptionally and very weakly. Vagina from castrates invariably develops a lively spontaneous activity with high contraction frequency and great amplitude. This can be dampened or inhibited by pre-treating the castrated animal with oestrin.

From this the conclusion is drawn that the vagina possesses an inherent spontaneous muscular activity that is dampened through the influence of the oestrin.

Vaginal muscle from rats with a normal sexual cycle is positively adrenotropic in all sexual phases, vaginal muscle from castrates is negatively adrenotropic. The negative reaction to adrenaline shown by the vagina of castrates can be converted into positive by pre-treatment of the castrate with oestrin.

The amplitude of the adrenaline contraction is smaller in pro-oestrus than in the other sexual phases. This is in all probability owing to the fact that the tonus of the vaginal musculature is highest in the heat phase. This assumption is strongly supported by certain observations made on living, unaesthetized animals.

Vaginal muscle from rats with a normal sexual cycle is refractory to oxytocin in all sexual phases. Vaginal muscle from castrates responds to oxytocin by an increase in tonus and contraction frequency. This effect is inhibited if the castrated animal is pre-treated with oestrin.

#### References.

- GENELL, S.: Uterin- och vaginalmuskulaturens funktionella uppgifter i den icke gravida organismen, Lund 1937.  
—, Acta obstet. gynec. scand. 1939. 19. 113.  
GUNN, J. A. and D. S. DAVIES: J. Physiol. 1920. 54 LXXXVI.  
GUNN, J. A. and K. J. FRANKLIN: Proc. Roy. Soc. 1922. 94B. 197.  
TEMPLETON, R. D., I. STEIN and S. SCHOCHET: Amer. J. Obstet. Gynec. 1931. 21. 754.  
WADDELL, J. A.: J. Pharmacol. 1917. 9. 411.
-

From the Institute of Theoretical Physics, University of Copenhagen.

## Rate of Penetration of Ions into Erythrocytes.

By

L. HAHN and G. HEVESY.

(Received 25 October 1941.)

---

In the study of the permeability of phase boundaries to ions usually an inorganic salt, the ions of which are to be investigated, is added to one of the phases and the time is measured after which a certain concentration of the salt can be ascertained in the other phase. The result of such experiments indicates, however, not the resistance which one kind of ions encounters when passing the phase boundary, but the resultant of the hindrance of both ions of the salt or, if a cation, for example sodium, present in one phase interchanges with potassium, for example, present in the other phase, it indicates the resultant of the hindrance of the passage of the sodium and of the passage of the potassium ion through the phase boundary. If one of the two ions encounters a great resistance when passing the membrane it will compel the other ion to move slowly as well.<sup>1</sup> Furthermore, this method implies that the ion can accumulate in the second phase. The hindrance which an ion encounters when passing the phase boundary can be measured by measuring the rate at which labelled and non-labelled ions interchange through the phase boundary. When one phase contains  $^{23}\text{Na}$  ions, the other phase besides  $^{23}\text{Na}$  ions also  $^{24}\text{Na}$  ions of negligible weight, we obtain by determining the rate at which  $^{24}\text{Na}$  penetrates into the second phase a correct measure of the hindrance which sodium ions encounter when passing the phase boundary and, thus, a cor-

---

<sup>1</sup> The influence which the anions exercise on the rate of penetration of the cations is discussed on page 220.

rect measure of the permeability of the phase boundary to sodium ions if only we perform the experiment in such a way that the amount of  $^{24}\text{Na}$  returning from the second phase into the first phase can be disregarded. This will be the case if by augmenting the duration of the experiment the amount of  $^{24}\text{Na}$  accumulating in the second phase increases correspondingly. We can thus correctly and most easily determine the permeability of phase boundaries through interchange experiments. In this paper, the rate of interchange of phosphate, chloride, and sodium between plasma and corpuscles is discussed.

### Penetration of Labelled Phosphate into the Corpuscles of the Rabbit.

We extended our former measurements (ATEN and HEVESY 1938, 1939, HAHN and HEVESY 1938, 1940) by further experiments on the penetration of labelled phosphate into the corpuscles. The distribution of  $^{32}\text{P}$  between corpuscles and plasma of equal weight is seen in Fig. 1. In these experiments, the  $^{32}\text{P}$  was added as sodium phosphate of negligible weight to rabbit blood. The blood to which ammonium oxalate or heparin was added was saturated with a mixture containing 5 p. c.  $\text{CO}_2$  and 95 p. c.  $\text{O}_2$  and was shaken in the thermostat kept at  $37^\circ$ . Corpuscles and plasma were separated by centrifuging sharply and the activity of the fractions obtained was compared. We omitted washing of the corpuscles, since such a procedure may lead to a removal of some of the  $^{32}\text{P}$  present in the corpuscles.

To determine the amount of plasma adhering to the centrifuged corpuscles we washed, in test experiments, the corpuscles thoroughly with a physiological sodium chloride solution and determined the nitrogen content of the sodium chloride solution and of a plasma sample by Kjeldahl's method. From the figures obtained the amount of plasma present in the sodium chloride solution was calculated to be 3 per cent of the plasma content of the blood. This is the upper limit of the percentage plasma adhering to the centrifuged corpuscles, since some corpuscle nitrogen may have leaked into the sodium chloride solution during the washing procedure.

Another method to test the amount of plasma adhering to the corpuscles is the following. Labelled phosphate is added to blood kept at  $0^\circ$  and the blood sample is centrifuged at once.

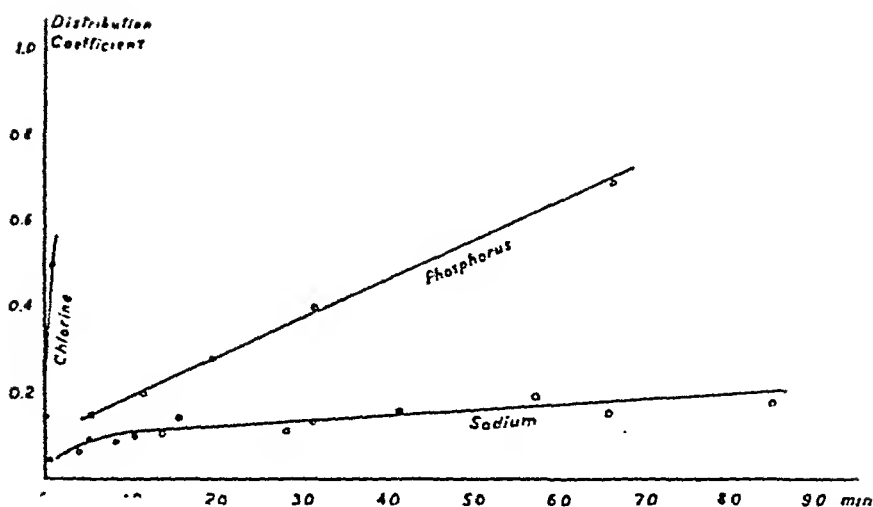


Fig. 1. Distribution of labelled ions between corpuscles and plasma of equal weight at 37°. (Rabbit blood was used in the experiments with chloride and phosphate, dog blood<sup>1</sup> in the experiments with sodium. The ordinate indicates the distribution coefficient of the labelled ion between corpuscles and plasma of equal weight.)

When plasma adheres to the corpuscles the corresponding amount of labelled phosphate will be found in the corpuscle fraction. By this method, the corpuscle fraction was found to contain 3 per cent of the plasma. This value indicates the upper limit of the amount of adhering plasma, since some of the  $^{32}\text{P}$  found in the corpuscle fraction may be due to a replacement of a part of the non-labelled phosphate ions adsorbed on the surface of the corpuscles by labelled ions.

That the line seen in Fig. 1 does not start at 0 is due partly to the presence of some plasma containing  $^{32}\text{P}$  in the corpuscle fraction and presumably partly to the presence of some labelled phosphate adsorbed from the plasma by the surface of the corpuscles. In view of the very extended corpuscle surface it is conceivable that non-negligible amounts of the plasma constituents get adsorbed on the surface of the corpuscles and a very short time may suffice to replace adsorbed non-labelled phosphate ions by labelled ones.

Furthermore, it is seen in Fig. 1 that the rate of penetration of the phosphate ions into the corpuscles is a fairly slow process. After the lapse of 1 hour, 1 gm. of plasma contains about twice

<sup>1</sup>  $^{32}\text{P}$  added to dogs blood kept at 37° was found to be almost equally distributed after the lapse of 2 hours between plasma and corpuscles of equal weight.

as much  $^{32}\text{P}$  atoms as 1 gm. of corpuscle. From 100  $^{32}\text{P}$  atoms added to the blood, about 26 are found in the corpuscles, and 74 in the plasma.

### Experiments of Long Duration.

Since the composition of drawn blood changes on standing, it is not advisable to carry out experiments with drawn blood lasting more than a few hours.

Information about the amount of  $^{32}\text{P}$  which penetrates into

tained through experiments carried out in vivo (ÁRÉN and HEVESY 1939). The results of such experiments are seen in Table 1. The specific activity stated is the ratio of the  $^{32}\text{P}$  and the total P content of the sample. The specific activity of the plasma inorganic P is taken to be 100.

In the case of a complete interchange between plasma inorganic P and corpuscle acid soluble P these P fractions should have the same specific activity. If the ratio of the specific activity of the inorganic P of the plasma and the P of the corpuscle is, for example, 10, then every tenth acid soluble corpuscle P atom got replaced by P atoms present in the plasma at the start of the experiment. In all these experiments, the activity level of the plasma was kept approximately constant. This state was obtained by injecting labelled phosphate to the rabbit throughout the experiment.

In the first phase of the experiment, the rate of accumulation of  $^{32}\text{P}$  in the corpuscles is slower than the rate of incorporation of  $^{32}\text{P}$  into the easily hydrolysable organic P compounds which takes place inside the corpuscles. The rate of formation of active, easily hydrolysable P compounds is, thus, regulated by the speed of intrusion of  $^{32}\text{P}$  into the corpuscles. The renewal of some of the "non-hydrolyzable" organic P compounds takes place at a comparatively slow rate, and the rate of formation of active molecules of such compounds is not regulated by the influx of  $^{32}\text{P}$  into the corpuscles but by the speed of new formation of these "non-hydrolyzable" acid soluble P molecules. After the lapse of 9 days, we still find in the corpuscles not renewed acid soluble P molecules, while practically none are present after the lapse of 50 days. During this interval, the major part of the corpuscles has also been renewed.

Table 1.

*Penetration of labelled P into the corpuscles of the rabbit in experiments in vivo.*

Administration of $^{32}\text{P}$	Time	Specific activity of corpuscle P (That of the inorganic plasma P taken to be 100)
Intravenous injection throughout the experiment	215 min.	Inorganic P . . . . . 12.7 Average hydrolysable or- ganic P . . . . . 12.7
Subcutaneous injection through- out the experiment	11.5 hours	Inorganic P . . . . . 25
		P obtained by hydrolysis in 1 N $\text{H}_2\text{SO}_4$ at $100^\circ$ for 15 hours . . . . . 25
		P obtained by hydrolysis in 1 N $\text{H}_2\text{SO}_4$ at $100^\circ$ for 120 hours . . . . . 25
		Acid soluble residual P . . 13
	9 days	Total acid soluble P . . . 94
	50 days	Total acid soluble P . . . 100

### Penetration of $^{32}\text{P}$ into the Corpuscles of Human Subjects.

Labelled phosphate was found to penetrate at a similar rate into the corpuscles of human as into the corpuscles of rabbit blood. In two experiments carried out in vitro at  $37^\circ$ , after the lapse of 95 minutes, 29.2 and 31.7 percent of the labelled phosphate ions added to the blood were found to be in the corpuscles.

### Penetration of Phosphate into Nucleated Corpuscles.

The rate of interchange between plasma phosphate and corpuscle phosphate was found to be much slower in hen's blood than in blood containing non-nucleated erythrocytes. The rate of renewal of the organic P compounds was also found to be slower in the corpuscles of the hen. The distribution of  $^{32}\text{P}$  between plasma and corpuscles of the hen is seen in Table 2.



Table 2.

*Distribution of  $^{32}\text{P}$  between plasma and corpuscles of the hen in experiments in vitro at 37°.*

	Time in hours	Percentage $^{32}\text{P}$ found in the corpuscles	Distribution coefficient of $^{32}\text{P}$ between corpuscle and plasma of equal weight
a)	1	6.05	0.14
	3.3	10.8	0.26
b)	2.2	4.2	0.15
	<sup>1</sup> 2.2	3.2	0.11
c)	1.7	5.0	0.12
	4.7	6.3	0.23

Tabelle 3.

*Extent of renewal of acid soluble P compounds in the corpuscles of the hen in the course of 4.7 hours at 37°.*

Fraction	P content mgm. per cent	Relative specific activity	
Plasma inorganic P . . . . .	6.67	100	
Corpuscle inorganic P . . . . .	4.71	6.25	100
Hydrolyzed during 7 min. . . . .	2.68	4.48	72
Hydrolyzed 7—180 min. . . . .	25.1	2.06	33
Non-hydrolyzed . . . . .	31.6	0.77	12.3

The P atoms present in the nucleated erythrocytes of the frog were found to be replaced at a very slow rate, as seen in Table 4.

<sup>1</sup> Corpuscles washed with NaCl solution.

Table 4.

*Distribution of  $^{32}\text{P}$  between plasma and corpuscles of the frog in experiments in vivo.*

Time in hours	Temperature	Distribution coefficient of $^{32}\text{P}$ between corpuscles and plasma of equal weight
10	15°	0.28
14	20°	1.10
50	20°	1.40

### Rate of Penetration of $^{32}\text{P}$ into the Corpuscles in the Presence of Excess Plasma Phosphate.

In two experiments, we added besides  $^{32}\text{P}$  an appreciable amount of additional sodium phosphate to the blood increasing the inorganic phosphate content of the plasma to several times its normal value. As seen in Table 5, the rate of penetration of  $^{32}\text{P}$  into the corpuscles is not much influenced by a very substantial increase in the phosphate concentration of the plasma. This result is to be interpreted in the following way. The number of phosphate ions penetrating into the corpuscles is proportional to the number of phosphate ions present in the plasma. If no excess phosphate is added to the plasma for each phosphate ion penetrating into the corpuscles, a phosphate ion will move from the corpuscles into the plasma, since otherwise a constant decrease in the phosphate concentration of the plasma would take place. That an incessant interchange of phosphate between plasma and corpuscles takes place can be shown by adding labelled phosphate of negligible weight to the plasma. As long as the  $^{32}\text{P}$  concentration of the corpuscle inorganic P is much lower than the  $^{32}\text{P}$  concentration of the plasma inorganic P — what is always the case, except for experiments of long duration — a  $^{32}\text{P}$  atom penetrating from the plasma into the corpuscles will be replaced by a  $^{31}\text{P}$  atom moving in the opposite direction and, correspondingly, an accumulation of  $^{32}\text{P}$  will take place in the corpuscles. If, by replacing a portion of the plasma chloride by phosphate, the phosphate concentration is raised to twice its original value, during the same time twice as many P atoms

will penetrate from this plasma into the corpuscles than from the normal plasma. The radio-phosphate ions moving from the plasma into the corpuscles will now be replaced partly by stable phosphate and partly by chloride or other anions present in the corpuscles. Since the stable phosphate obviously behaves in the same way as the radiophosphate, one part of the phosphate ions penetrating into the corpuscles will be replaced by phosphate ions previously located in the corpuscles, another part of the phosphate ions being replaced by chloride ions. The amount of phosphorus replaced in the plasma by chloride (other anions) originally present in the corpuscles can be determined by measuring the decrease in the P content of the plasma, the amount of plasma P replaced by corpuscle P, however, by determining the percentage of  $^{32}\text{P}$  which is to be found in the corpuscles. If we find, for example, by radioactive measurement that 20 per cent of the  $^{32}\text{P}$  and by chemical determination that 10 per cent of the  $^{31}\text{P}$  left the plasma after raising the plasma phosphate concentration by adding some excess phosphate and  $^{32}\text{P}$ , we can conclude that half of the phosphate ions which penetrated into the corpuscles were replaced by phosphate ions located previously in the corpuscles (interchange) while the other half was replaced by other anions than phosphate located previously in the corpuscles (accumulation).

Table 5.

*Distribution of  $^{32}\text{P}$  between plasma and corpuscles of the rabbit in experiments in vitro at 37°.*

	Time in min.	P added	Per cent of $^{32}\text{P}$ added found in the corpuscles
a)	70	$^{32}\text{P}$ of negligible weight . . . . .	19.7
	70	$^{32}\text{P}$ + 8 fold increase of plasma phosphate . . . . .	21.4
b)	90	$^{32}\text{P}$ of negligible weight . . . . .	32.0
	90	$^{32}\text{P}$ + 7 fold increase of plasma phosphate . . . . .	32.1

In the first experiment, by adding active phosphate buffer to the blood, we increased the inorganic P content of the plasma from 3.8 to 30.8 mgm. per cent. In the second experiment, 0.1

cc. isotonic active phosphate buffer was added to 3 cc. blood, increasing thus the phosphate content of the plasma to 7.3 times its normal value. In the test experiment, 3 cc. blood was shaken with 0.1 cc. isotonic NaCl solution containing  $^{32}\text{P}$  of negligible weight.

From 100  $^{32}\text{P}$  atoms added, the corpuscles contained 19.7 and 21.4 atoms, respectively, in the first experiment, and 32.0 and 32.1 atoms, respectively, in the second experiment. These figures state obviously the percentage of phosphate ions which migrated in the course of the experiment from the plasma into the corpuscles, but they supply no information about the reversed process and, thus, no information on the problem how much excess phosphate was accumulated in the corpuscles. This question is discussed on p. 209.

### Effect of Temperature on the Rate of Penetration of Phosphate into the Corpuscles.

Early workers (EGE 1919, IVERSEN 1921) arrived at the result that the corpuscle membrane of human and rabbit blood is only slightly permeable to phosphate at  $3^\circ$  and that this permeability increases somewhat with a rise in temperature. HALPERN (1936) found later that phosphate diffuses across the corpuscle membrane not at all at  $3^\circ$  and only at a very slow rate at  $23^\circ$ ; at  $37.5^\circ$ , however, the rate of diffusion is greatly accelerated. Penetration of phosphate into the corpuscles was tested by noting whether inorganic phosphate added to the blood would enter the corpuscles or whether it would be carried out of the corpuscles with water after the addition of hypertonic sodium chloride or sucrose solutions to the blood.

The application of radiophosphorus in permeability studies leads to the result that the amount of phosphate penetrating the corpuscle membrane is much smaller at  $0^\circ$  than at  $37^\circ$ , the permeability being, however, easily determinable even at  $0^\circ$ . The results of such studies are seen in Table 6.

In the experiments lasting 64 and 72 minutes, in contrast to our usual procedure, we washed the corpuscles once with 0.9 per cent sodium chloride solution. As mentioned on p. 194, the centrifuged corpuscles contain some plasma and some of the  $^{32}\text{P}$  found in the corpuscle fraction is present in the adhering plasma. While, usually, this  $^{32}\text{P}$  can be disregarded, that is not

the case in experiments of short duration carried out at low temperatures. It is, therefore, of importance to remove the adhering plasma in such experiments. In the experiment lasting 7 hours, we omitted washing of the corpuscles. The same amount of  $^{32}\text{P}$  which penetrated into the corpuscles in the course of 7 hours at  $0^\circ$  was found to be present at  $37^\circ$  after about  $1\frac{1}{2}$  hour. By increasing the temperature from  $0^\circ$  to  $37^\circ$  the rate of penetration of phosphate into the corpuscles thus increases about 14 times.

Table 6.

*Effect of temperature on the rate of penetration of  $^{32}\text{P}$  into the corpuscles of the rabbit.*

Time	Temperature	Per cent of $^{32}\text{P}$ added to the blood present in the corpuscles
19 min. . . . .	$37^\circ$	12.2
31 " . . . . .	$37^\circ$	16.6
64 " . . . . .	$0^\circ$	1.29
66 " . . . . .	$37^\circ$	25.9
72 " . . . . .	$0^\circ$	1.24
72 " . . . . .	$37^\circ$	19.3
90 " . . . . .	$5^\circ$	3.26
90 " . . . . .	$37^\circ$	19.7
90 " . . . . .	$37^\circ$	25.7
97 " . . . . .	$37^\circ$	23.8
105 " . . . . .	$37^\circ$	22
7 hours . . . . .	$0^\circ$	14.6
7 " . . . . .	$0^\circ$	12.7

A marked effect of increasing temperature on the rate of penetration of phosphate can be expected in view of the fairly slow rate of penetration of phosphate into the corpuscles. Usually a low rate of diffusion or of a similar process goes hand in hand with the high temperature coefficient. The diffusion rate equals

$$D = A.S.e^{-\frac{Q}{RT}}.$$

In this equation, A denotes the number of collisions, S the probability of energetically satisfactory encounters, Q the energy of activation, R the gas constant, and T the absolute temperature.

Since  $S$  is often  $= 1$ , the magnitude of  $e^{-\frac{Q}{RT}}$  determines mainly the rate of diffusion. In the case of a slow penetration,  $e^{-\frac{Q}{RT}}$  will be small and  $Q$  correspondingly large. The effect of a change of  $T$  on the value of  $e^{-\frac{Q}{RT}}$  and thus on the temperature coefficient will be very much larger if  $Q$  has a larger value than in the opposite case.

For example, if  $\frac{Q}{RT} = 10$ , the replacement of  $T$  by  $T/2$  will result in a reduction of the value of  $e^{-\frac{Q}{RT}}$  from  $4.5 \cdot 10^{-5}$  to  $2.1 \cdot 10^{-9}$ , thus to less than  $1/5000$  of the initial value while, if  $\frac{Q}{RT}$  is taken to be  $= 1$ , a corresponding change in  $T$  will result in a decrease of  $e^{-\frac{Q}{RT}}$  from  $0.37$  to  $0.14$ , only.

Assuming  $S = 1$ , the heat of activation of the penetration of phosphate ( $Q$ ) can be calculated from the equation

$$\frac{D_{37^{\circ}}}{D_{0^{\circ}}} = \frac{e^{-\frac{Q}{R \cdot 310}}}{e^{-\frac{Q}{R \cdot 273}}}$$

and as  $\frac{D_{37^{\circ}}}{D_{0^{\circ}}}$  was found to be  $= 14$ ,  $Q$  works out to be  $15000$  cal.

### Incorporation of $^{32}\text{P}$ into Organic Compounds in Blood Hemolysate.

As we stated above (p. 196), the rate of incorporation of  $^{32}\text{P}$  into some of the  $\text{P}$  compounds of the corpuscles is faster than the rate of penetration of  $^{32}\text{P}$  through the corpuscle membrane. It is, thus, the rate of the last mentioned slower process which determines the rate of interchange of corpuscle  $\text{P}$  and plasma  $\text{P}$  as long as the specific activity of the corpuscle inorganic  $\text{P}$  remains behind the specific activity of the plasma inorganic  $\text{P}$ . This statement is based on the fact that, while the specific activity of the corpuscle pyrophosphate  $\text{P}$ , for example, some time after the start of the experiment not much differs from the specific activity of the corpuscle inorganic  $\text{P}$ ,  $1$  mgm. of corpuscle inorganic  $\text{P}$  is found to be much less active than  $1$  mgm. of plasma inorganic  $\text{P}$ . This conclusion involves the assumption that the fraction secured from the deproteinated corpuscles as inorganic phos-

phate was actually present as such in the corpuscles and not as a constituent of a not yet known labile P compound. This assumption may probably be correct. The distribution coefficient of free phosphate between plasma and corpuscles can be expected not to differ much from the distribution coefficient of chloride and other free anions between plasma and corpuscles. Thus, 1 gm. of corpuscle can to be expected to contain somewhat less than half as much free P as 1 gm. of plasma.<sup>1</sup> This conclusion is born out by the experiment.

The process of incorporation of <sup>32</sup>P into organic phosphorus compounds can be studied in blood hemolysate free from permeability considerations. We hemolyzed rabbit corpuscles by repeatedly cooling rabbit blood to liquid air temperature. The hemolysate was shaken for 2 hours at 37° with labelled phosphate of negligible weight. From the trichloroacetic filtrate, the inorganic P present as such in the hemolysate was precipitated as magnesium salt, the filtrate was then made 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and kept at 100° for 7 minutes. By this procedure, the labile P of the adenosintriphosphoric acid is split off. By a similar procedure, other P fractions were also secured. The results of these experiments are seen in Table 7.

Table 7.

*Specific activity of the P fractions of rabbit blood hemolysate kept for 2 hours at 37°.*

Fraction	P content in mgm	Percentage distribution of <sup>32</sup> P	Specific activity
Inorganic P . . . . .	4.45	85	100
Hydrolyzed 0—7 min. . . . .	2.06	9.2	23.5
Hydrolyzed 7—100 min. . . . .	3.79	—	5.8
Hydrolyzed 7 min.—17 hours. . .	10.88	5.37	2.58
Residual acid soluble P . . . . .	1.62	0.33	1.07
Total organic acid soluble P . . .	14.6	14.9	6.29

<sup>1</sup> We can expect

$$\frac{Cl_{corp. H_2O}^-}{Cl_{pl. H_2O}^-} = \frac{(a \times H_2PO_4^-)_{corp. H_2O} + (b \sqrt{HPO_4^{--}})_{corp. H_2O}}{(a \times H_2PO_4^-)_{pl. H_2O} + (b \sqrt{HPO_4^{--}})_{pl. H_2O}}$$

where *a* denotes the fraction of phosphate being present as primary ion and *b* the fraction of phosphate being present as secondary ion.

In an other experiment the pyrophosphate fraction had a higher specific activity (41).

All acid soluble organic P fractions secured from the hemolysate were found to contain  $^{32}\text{P}$ , *phosphorylation is thus occurring in the blood hemolysate*. The percentage of adenosintriphosphate, which is resynthesized in the hemolysate, is, however, smaller than the percentage resynthesized in the corpuscles during the same time. In the experiment with intact corpuscles, in the course of  $1\frac{1}{2}$  hours, the pyrophosphate P present in the corpuscles had nearly the same activity as the inorganic P present in the corpuscles. In the hemolysate, in the course of 2 hours, the activity of the pyrophosphate P amounted to only about  $\frac{1}{4}$  to  $\frac{1}{2}$  of the activity of the inorganic P. In fact, the difference between the result obtained in the corpuscles and the hemolysate is even larger than stated above. In the hemolysate, in the course of the experiment the amount of inorganic P increases due to the successive decomposition of organic P compounds. This fact leads to a corresponding decrease of the specific activity of the inorganic P. When comparing the specific activity of the pyrophosphate P split off by hydrolysis with the specific activity of the inorganic P present in the hemolysate at the end of the experiment we therefore overestimate the extent of renewal of the adenosintriphosphate.

The difference between the rate of resynthesis of the other P compounds in the hemolysate and in the corpuscles is still larger than that found in the case of adenosintriphosphate. In the corpuscles, after the lapse of  $1\frac{1}{2}$  hours, the activity of the P obtained by hydrolysis for 12 hours after removal of the pyrophosphate amounted to 57 per cent of the activity of the inorganic P of the corpuscles. In the hemolysate, in the course of 2 hours, the corresponding figure was only 5.8 per cent. While, therefore, phosphorylation processes are going on in the hemolysate, their rate remains much behind the corresponding processes going on in the intact corpuscles.

That the rate of resynthesis of organic P compounds is strongly reduced in the hemolysate follows also from the fact that the hemolysate contains more inorganic P and less organic P than intact blood.<sup>1</sup> As shown by using labelled P as an indicator,

---

<sup>1</sup> A detailed study of the effect of hemolysis on the content of different P compounds present in horse blood was recently made by SJÖBERG (1940), comp. also SALOMON and coworkers (1940).



an alternative degradation and resynthesis of adenosintriphosphate and also of other organic P compounds takes place in the corpuscles and also in the hemolysate. In the hemolysate the resynthesis obviously lags behind the degradation and the inorganic P content correspondingly increases in the course of the experiment.

The rate of resynthesis of organic P compounds in the hemolysate is much reduced by lowering the temperature. As seen in Table 8, at 0° about  $\frac{1}{4}$  as many labelled organic P compounds were synthesized as at 37°.

Table 8.

*Effect of temperature on the formation of labelled organic P compounds in rabbit blood hemolysate.*

Time in hours	Temp.	Percentage of $^{32}\text{P}$ added found in the organic fraction	P content in mgm. p. c.		Specific activity	
			Inorganic P	Organic P	Inorganic P	Organic P
1	37°	11.6	9.38	15.0	100	8.20
	0°	3.34	9.05	15.3	100	2.00
2	37°	17.2	5.55	18.9	100	5.09
	0°	7.10	3.76	20.6	100	1.20

The lowering of the rate of formation of labelled adenosintriphosphate in the hemolysate is possibly due partly or wholly to destruction of cozymase taking place in the hemolysate. In a hemolysate of the corpuscles of horse blood LENNERSTRAND (1941) found, 3 hours after hemolysis, a destruction of 40 per cent of the cozymase present in the corpuscles. LENNERSTRAND found also that the increase of the inorganic phosphate content of the hemolysate is due at least partly to dephosphorylation of adenosintriphosphate. The composition of a mixture of hemolysate, cozymase and adenosintriphosphate was found, however, not to change.

RUNNSTRÖM, LENNERSTRAND and their associates (LENNERSTRAND 1941) observed in a hemolysate of corpuscles of horse blood a synthesis of organic phosphate occurring at the expense of the oxydation of hexosediphosphate. The reaction was found to require the presence of diphosphodinuclotide, coenzyme and

methylenblue or another dye which acts as oxygen carrier. While dismutation and phosphorylation were found to take place in the hemolysate, all processes consecutive to the formation of monophosphoglyceric acid were found to be absent.

The intermediary formation of inorganic phosphate is a normal element in the phosphorylation circuit going on in the corpuscles. In the intact corpuscle the inorganic phosphate split off is soon incorporated into another organic molecule and its splitting off is thus hidden from observation, except from using an isotopic indicator which reveals that we are faced with a dynamic equilibrium. If the phosphorylation mechanism is disturbed in the corpuscle or in the hemolysate, incorporation of phosphate into organic compounds takes place at a reduced rate only and an accumulation of free phosphate takes place in the blood.

### Effect of Poisons on the Enzymes Responsible for the Synthesis of Organic P Compounds in the Corpuscles.

In normal corpuscles, the penetration of  $^{32}\text{P}$  into the corpuscle is followed by an incorporation into organic molecules which, in turn, give off nonlabelled P. By this process, the corpuscle inorganic P is prevented from obtaining for quite a while a high specific activity. If, however, a formation of organic P compounds is hindered, and this should be the case in a poisoned corpuscle, the  $^{32}\text{P}$  migrating into the corpuscle would remain in the inorganic P fraction and this fraction would soon become strongly active.

We failed to inhibit the process of resynthesis by adding fluoride to rabbit blood, as seen in Table 9. 2 cc. blood + 0.5 cc.

Table 9.

*Distribution of  $^{32}\text{P}$  between plasma and corpuscles after 159 min, in the absence and presence of fluoride.*

	Percentage distribution of $^{32}\text{P}$	
	Plasma	Corpuscle
Control . . . . .	57.2	42.8
Fluoride . . . . .	56.4	43.6

0.2 mol sodium fluoride solution were first shaken at 37° for 87 minutes.  $^{32}\text{P}$  was then added and the blood was kept for further 159 minutes at 37°. In the control experiments, the sodium fluoride solution was replaced by RINGER's solution. Investigating phosphorylation in the hemolysate of the corpuscle of the horse, LENNERSTRAND (1940) found that addition of fluoride to the hemolysate does not inhibit phosphorylation, though the rate of phosphorylation gets somewhat reduced.

The addition of KCN to the blood, however, had a marked though highly varying effect on the system of resynthesis. Rabbit blood was shaken with different volumes (see Table 10) of an isotonic potassium cyanide solution ( $\text{pH} = 7.5-8.0$ ) at 37° for some time previous to addition of labelled phosphate of negligible weight. As seen in Table 10, the corpuscles treated in this way took up less labelled phosphate than the corpuscles which were not treated with cyanide. Furthermore, the distribution of  $^{32}\text{P}$  between the different phosphorus compounds present in the corpuscles was different in the controls and in the cyanide treated erythrocytes. In the corpuscles treated with cyanide, most of the  $^{32}\text{P}$  present was in the inorganic fractions. From this result follows that it is not so much the permeability of the corpuscles which is influenced by the presence of cyanide as the phosphorylation process occurring in the corpuscles.

Table 10.

*Uptake of  $^{32}\text{P}$  by the corpuscles of the rabbit at 37° after treatment with cyanide solution at 37°.*

Mgm. KCN added per cc. of blood	Shaken previous to the addition of labelled phosphate min.	Shaken after addition of labelled phosphate min.	Percentage uptake of $^{32}\text{P}$ by the corpuscles	Percentage distribu- tion of $^{32}\text{P}$ between the P fractions of the corpuscles	
				Inorganic P	Organic P
—	—	97	23.8	30	70
—	—	101	25.5	34	66
—	—	105	22.0	19	81
0.1	78	95	17.5	52	48
1.5	22	64	16.8	—	—
1.5	92	101	13.5	91	9
2.0	155	102	15.6	60	40
2.0	51	97	12.8	56	44

## Accumulation of Phosphate in the Corpuscles.

As already mentioned, the *interchange* of P atoms between plasma and corpuscles is not restricted to the P atoms of the free phosphate present in the corpuscles, in contrast to the *accumulation* of additional phosphate. If we increase the phosphate concentration of the plasma we may expect to obtain, after a sufficiently long time, a corresponding increase in the free phosphate concentration of the corpuscles. The exact determination of the free phosphate content of the corpuscles encounters some difficulties, since even a slight decomposition of the large amounts of organic phosphorus compounds present in the corpuscles during the separation and extraction processes will appreciably influence the amount of free phosphate found to be present in the corpuscles. This fact may be partly or wholly the reason why such varying values are found for the inorganic phosphate concentration of the corpuscles.<sup>1</sup> The average value found for the free P content of the corpuscles amounts to about 1.5 mgm. per cent. Since rabbit blood is composed of about 2 parts of plasma and 1 part of corpuscles and the corpuscles contain somewhat less than  $\frac{1}{2}$  as much inorganic P as 1 gm plasma, we can expect from the phosphate added to the blood about  $\frac{1}{6}$  to penetrate into the corpuscles.

We determined the increase in the phosphate concentration of the corpuscles due to addition of phosphate to the plasma in the following experiments. To 2 cc. samples of rabbit blood 0.04 cc. phosphate buffer of physiological concentration was added. Half of the samples obtained was centrifuged at once, while the other half was first shaken for  $2\frac{1}{2}$  hours in a  $O_2$ — $CO_2$  atmosphere at  $37^\circ$ . Both plasma samples obtained were precipitated with 5 per cent trichloroacetic acid and the P content of the filtrate obtained was determined by the method of Fiske and Subbarow. The result obtained is seen in Table 11.

Thus, 1.54 mgm. per cent or 12.5 per cent of the plasma phosphate, corresponding to 17.6 per cent of the excess phosphate added, left the plasma for the corpuscles in the course of  $2\frac{1}{2}$  hours. During the same time, 35 per cent of the  $^{32}P$  added to the plasma was found by radioactive measurement to have penetrated into the corpuscles.

<sup>1</sup> Comp., for example, L. HALPERN (1936).

14—413286. *Acta phys. Scandinav.* Vol. 3.

Table 11.

*Distribution of phosphate added to the blood between plasma and corpuscles.*

Sample	Acid soluble P content of the plasma in mgm. per cent	
	At the start	2½ hours later
I . . . . .	12.20	10.66
II . . . . .	12.12	10.72
III . . . . .	12.67	10.74
IV . . . . .	12.30	10.73
V . . . . .	12.16	10.70
VI . . . . .	12.21	10.73
VII . . . . .	12.25	10.80
VIII . . . . .	12.28	10.73
IX . . . . .	12.27	10.73
Average value . . .	12.27	10.73

As mentioned on p. 200, this difference may be interpreted in the following way. 12.5 per cent of the phosphorus atoms present at the start of the experiment in the plasma accumulated during the experiment in the corpuscles, increasing the inorganic P content of the erythrocytes. Besides this accumulation, a replacement of a part of the inorganic P and of the organic P of the corpuscles by plasma P (interchange) took place as well. The percentage P atoms present at the start of the experiment in the plasma, which reached the corpuscles at the end of the experiment, is given by the percentage <sup>32</sup>P found at the end of the experiment in the corpuscles. By subtracting from this figure (35 per cent) the percentage of plasma P which accumulated in the corpuscles we arrive at the percentage of plasma P which reached the corpuscles solely by interchange (replacement). This percentage is found to be 22.5.

In another experiment, to 17 cc. of rabbit blood 0.3 cc. phosphate buffer containing 3.8 mgm. of P per cc. was added. An aliquot of the blood was centrifuged at once, another one was shaken at 37° for 2½ hours. The determination of the plasma phosphate gave the following results.

Table 12.

*Distribution of phosphate added to the blood between plasma and corpuscles of the rabbit.*

Acid soluble P content of the plasma in mgm. per cent.		
At the start		2½ hours later
14.4, 14.4, 14.7 . . . .	I	11.7
	II	12.0
	III	11.8
	IV	12.6
Average 14.5 . . . . .		12.0

Thus, after increasing the plasma P content from 3.5 mgm. per cent to 14.5 mgm. per cent, 2.5 mgm. per cent P corresponding to 23 per cent of the phosphate added left the plasma and accumulated in the corpuscles.

Since the total acid soluble P content of the corpuscles is about 80 mgm. per cent, an increase in the P content of the corpuscles amounting to 5 mgm. increases the total P content of the erythrocytes with 6 per cent, only.<sup>1</sup>

In contrast to the excess phosphate added, the plasma <sup>32</sup>P gets distributed between most or all of the acid soluble P of the plasma and the total acid soluble P of the corpuscles. The organic molecules undergo enzymatic degradation and resynthesis and, in the course of this process, a replacement of organic P by inorganic P and, thus, by labelled P takes place. An increase in the amount of organic P compounds necessitates besides the presence of P excess an excess of all other ingredients necessary to the formation of such compounds. These are, however, available to a small extent only in the corpuscles. This fact makes it easily understandable that the whole plasma P ultimately interchanges with corpuscle P, while an increase in the concentration of plasma P leads but to a minor increase in the concentration of the total corpuscle P.

<sup>1</sup> In carrying out the above calculations, the blood is assumed to be made up of two parts of plasma and one part of corpuscles.

### Rate of Phosphate Accumulation in the Corpuscles.

From the fact that, after the lapse of a few hours, the specific activity of the free P of the corpuscles does not differ to any appreciable extent from the specific activity of most of the acid soluble organic P fractions present in the corpuscles, while the specific activity of the free plasma P is found to be much higher than the specific activity of the corpuscle P, we have drawn the conclusion that the penetration of phosphate through the corpuscle membrane is a fairly slow process. This result was checked by measuring the rate of intrusion of excess phosphate added to blood into the corpuscles. The phosphate concentration of rabbit plasma was raised by addition of phosphate buffer from 3.7 to 16.5 mgm. per cent and the decrease of the phosphate content of the plasma was determined at different intervals. As seen in Table 13, the excess phosphate penetrated at a fairly slow rate, only, into the corpuscles.

Table 13.

[ *Rate of penetration of excess phosphate added to blood into the corpuscles.* ]

Time in min.	Inorganic P content of plasma in mgm. per cent
0 . . . . .	16.5
13.5 . . . . .	16.3
52.5 . . . . .	15.6
141 . . . . .	14.4

In certain experiments,<sup>1</sup> inorganic P was found to leave the corpuscles and to enter the plasma even though the concentration in the plasma exceeded that in the corpuscles. This fact was interpreted as an indication that the transfer of substances across the corpuscle membrane cannot always be explained by the simple physico-chemical law of diffusion from a higher to a lower concentration, even with the modification described by DONNAN. The correctness of this interpretation can be challenged. The concentrations of inorganic phosphate in the corpuscle

<sup>1</sup> Comp. L. HALPERN (1936).

water and the plasma water differ for the same reason as the concentrations of the chloride ions in the erythrocytes and in the plasma differ. In equilibrium, 1 gm. of plasma contains about twice as much chloride, respectively phosphate, as 1 gm. of corpuscles. If, in the course of phosphorylation processes going on in the corpuscles, inorganic phosphate is made free, the equilibrium between corpuscle phosphate and plasma phosphate is upset and a part of the additional phosphate migrates into the plasma in spite of the fact that the phosphate concentration in the plasma is higher than in the corpuscles. The migration will come to an end as soon as the equilibrium ratio between plasma phosphate and corpuscle phosphate is obtained, a ratio which is somewhat less than 2, as mentioned above. The phosphate content of the plasma constantly changes, it increases if the phosphate taken up with the food gets absorbed, when bone apatite gets dissolved, when organic P compounds present in the tissue cells or corpuscles get decomposed, it decreases when glucose is absorbed into the circulation, when additional ossification takes place, when inorganic phosphate present in the tissue cells or in the corpuscles gets incorporated into organic molecules, and so on. An increase in the phosphate concentration of the plasma will lead to an influx of some phosphate into the corpuscles and a decrease to a movement in opposite direction. In contrast to the behaviour of chloride which responds almost momentarily to changes in the chloride concentration of the plasma (see p. 215), phosphate does not. The rate of passage of phosphate through the corpuscle membrane is fairly slow, it will take an appreciable time before equilibrium between the concentration of the plasma phosphate and the corpuscle phosphate is obtained. In the meantime, changes in the concentration of phosphate in the plasma will often take place which are independent of the happenings going on in the corpuscles. For these reasons, the ratio of plasma phosphate and corpuscle phosphate may never reach an equilibrium state but, nevertheless, the transfer of phosphate across the cell membrane can well be explained by the simple physico-chemical law of penetration. In such consideration we must always envisage the fact that it is not the concentration difference of the ion in the corpuscle water and the plasma water which matters, but the deviation from the equilibrium distribution ratio which can, and often does, deviate considerably from unity.



A closer analysis of the happenings in the corpuscles reveals the following facts. The high phosphate content of the corpuscles is due to an incorporation of a very substantial amount of phosphate in the molecules of adenosintriphosphate, hexosemonophosphate, diphosphoglycerate, and so on. These molecules are incessantly degraded and rebuilt in the course of the metabolic circle going on in the corpuscles. The larger part of the phosphate present in the corpuscles is thus incorporated into organic molecules and is no longer free phosphate. The maintenance of the great difference in the acid soluble P content of the corpuscles and of the plasma is thus dependent on the metabolic circle going on in the corpuscles. The accumulation of ions in plant and animal cells is found to be generally conditioned by metabolic processes going on in the organism; in the case of concentration of phosphate in the corpuscles the way in which the metabolic process performs the ionic concentration is clearly shown, while we are in the dark in other cases as to the mechanism of the process of accumulation. *This mechanism may be built up in some other cases on similar lines as described above.*

### Rate of Penetration of Labelled Chloride into the Corpuscles.

We arrived at the result that phosphate penetrates at a fairly slow rate into the corpuscles. When making this statement we compare the rate of penetration of phosphate with the rate of intrusion of chloride. Chloride ions are known to penetrate speedily into the corpuscles. The increase of the  $\text{CO}_2$  content of the blood is followed by an increase in the bicarbonate content of the erythrocytes. As a result of the increase in the bicarbonate content of the corpuscles, bicarbonate will move from the erythrocytes into the plasma and chloride from the plasma into the corpuscles. The interchange between chloride and bicarbonate which is intimately connected with respiration processes is very fast, in about 2 seconds half of the equilibrium distribution is reached (DIRKEN and MOOK, 1931).

The intrusion of ions from the plasma into the corpuscles involves three steps. The ion must reach the corpuscle membrane, it has to penetrate through the membrane, and it must be distributed in the water of the erythrocytes. Among these three

steps, the penetration through the membrane is the slowest process and determines, thus, the rate of intrusion. This is shown, for example, by the fact that compared with the  $\text{CO}_2$  absorption by hemoglobin solution which is practically finished after about 0.05 sec., the entry of the gas into the red blood corpuscles is appreciably slower and lasts about 3 sec.

In view of the very small resistance the chloride ions encounter when penetrating the corpuscle membrane, we can expect the chloride ions not only to interchange speedily with  $\text{HCO}_3^-$  ions but also with other  $\text{Cl}^-$  ions. Labelled  $\text{Cl}^-$  ions introduced into the plasma should soon be found in the corpuscles, and vice versa.

Mr. ZERAHN has investigated in this laboratory the rate of penetration of radiochloride into the corpuscles of the rabbit. The radiochloride was prepared by bombarding carbontetrachloride with neutrons and by extracting the radiochloride produced by the method of SZILARD and CHALMERS. A small volume of a physiological sodium chloride solution prepared from the chloride obtained by the process described above was added to rabbit blood. Since the rate of penetration was expected to be very rapid the experiments were carried out at  $0^\circ$  and the mixture was shaken for 1 min., only, previous to centrifuging.

To the active corpuscles separated by centrifuging the corresponding amount of non-active plasma was added, while the active plasma was mixed with a corresponding amount of non-active corpuscles. Two blood samples of the same weight were thus obtained, one of which contained active corpuscles and the other active plasma. The blood samples obtained by this procedure (about 100 mgm.) were mixed with 100 mgm. of  $\text{CaO}$  powder and were placed under the Geiger counter. Since the  $^{36}\text{Cl}$  used as an indicator has a half-lifetime of only 38 min., this procedure has obvious advantages over the usual process in which the blood samples are ashed or extracted. In these as in all other experiments, the sharply centrifuged corpuscles were not washed, since washing might lead to a substantial loss of labelled ions by the corpuscles.

1 gm. of corpuscle was found to contain about half as much  $^{36}\text{Cl}$  as 1 gm. of plasma. Since the chloride content of 1 gm. of corpuscle of the rabbit makes out 0.53 times the chloride content of 1 gm. of plasma (ADLERSBERG and GLASS 1932), in the course

of 1—3 min.<sup>1</sup> even at 0° a very large portion of the corpuscle chloride was replaced by labelled chloride originally present in the plasma. The rate of penetration of chloride into the corpuscles of the rabbit is, thus, more than 100 times larger than the rate of penetration of phosphate.

### Penetration of Labelled Sodium into the Corpuscles of the Rabbit.

In our first experiments (HAHN, HEVESY and REBBE, 1939), labelled sodium was administered to rabbits as sodium chloride by subcutaneous injections. After the lapse of 1 day, we found 1 gm. of sharply centrifuged, unwashed corpuscles to have a <sup>24</sup>Na content amounting to 14 per cent of that of 1 gm. of plasma. From these 14 per cent a few per cent are due to the <sup>24</sup>Na content of the adhering plasma while the rest is due to <sup>24</sup>Na penetrated into the corpuscles. The distribution ratio of <sup>24</sup>Na between plasma and corpuscles did, thus, not much differ from the corresponding distribution ratio of <sup>23</sup>Na as the sodium content of 1 gm. of corpuscle amounts to about 1/3 of the sodium content of 1 gm. of plasma. The specific activity of the sodium of the corpuscle did, thus, not much differ from the specific activity of the sodium of the plasma. Hence, we have to conclude that in the course of the experiment the major part or all of the corpuscle sodium interchanged with plasma sodium.

Experiments of short duration in which labelled sodium was administered by intravenous injection to the rabbit showed that the rate of interaction of the plasma sodium with the corpuscle sodium is not slow. After the lapse of 15 minutes, the activity of 1 gm. of corpuscles was found to amount to 11 per cent of that of 1 gm. of plasma (Table 14).

In another experiment, after the lapse of 11 minutes, the percentage ratio was found to be 9.

The comparison of the permeability of the wall of the corpuscles of the rabbit to sodium and to chloride is made difficult by the fact that the sodium content of the rabbit corpuscles is very low and amounts to only about 1/3 of the sodium content of the plasma. The amount of labelled sodium adsorbed on the

---

<sup>1</sup> As the separation of the corpuscles from the plasma by centrifuging lasts some time, the duration of the experiment was somewhat more than 1 min.

Table 14.

*Distribution of  $^{24}\text{Na}$  administered by intravenous injection between corpuscles and plasma of the rabbit.*

Time in min.	Percentage distribution ratio of $^{24}\text{Na}$ between corpuscles and plasma of equal weight
2.3 . . . . .	5.7
15.1 . . . . .	11
32 . . . . .	10
61 . . . . .	10
120 . . . . .	11

corpusele membrane may therefore constitute quite an appreciable part of the labelled sodium found in the centrifuged corpuscles. Furthermore, when only a fraction of the sodium ions of the plasma have penetrated into the corpuscles a proportional distribution of  $^{24}\text{Na}$  between plasma and corpuscles will be reached, which is not the case for  $^{38}\text{Cl}$ , since the concentration of chloride in the plasma and the corpusele water differs only to a minor extent. The corpusele water of the dog contains, however, nearly as much sodium as the plasma water and, therefore, the corpuseles of the dog and also the corpuscles of the cat are more suitable to be used in experiments in which the permeation of sodium is to be compared with the permeation of chloride. W. E. and E. T. COHN (1939), who were the first to determine the permeability of the corpuseles of the dog to sodium, found that, in the course of a few hours, an appreciable part of the corpusele sodium is replaced by plasma sodium. Similar values to those found by W. E. and E. T. COHN (1939) for the penetration of sodium into the corpuscles of the dog were obtained in our experiments, the results of which are given in Table 15 and Fig. 1. The rate of penetration of sodium into the corpuscles is lower than the rate of penetration of phosphate. While after the lapse of 1 hour, thus, in experiments of comparatively short duration at  $37^\circ$  the distribution ratio of  $^{32}\text{P}$  between corpuscles and plasma is found to be 0.6, the corresponding figure for  $^{24}\text{Na}$  is about 0.18.

Table 15.

*Distribution of  $^{24}\text{Na}$  between corpuscles and plasma of dog blood shaken with labelled sodium chloride at 37°.*

	Time in min.	Percentage of $^{24}\text{Na}$ added present in the corpuscles	Percentage distribution ratio of $^{24}\text{Na}$ between corpuscles and plasma of equal weight
<i>Dog A</i> . . . . .	5.1	7.9	9.6
	15.6	12.0	14.6
	57.0	15.9	19.4
<i>Dog B</i> . . . . .	4.0	4.9	6.6
	8.3	6.6	9.0
	13.6	8.0	10.9
	27.9	8.4	11.4
	41.2	11.7	15.8
	65.5	11.6	15.7
<i>Dog C</i> . . . . .	10.5	8.2	10.0
	31	11.0	13.4
	85	14.9	18.1

Similar values were found for the rate of permeation of  $^{24}\text{Na}$  into the corpuscles of the cat, as seen in Table 16.

Table 16.

*Distribution of  $^{24}\text{Na}$  administered by subcutaneous injection between corpuscles and plasma of the cat.*

	Time in hours	Percentage distribution ratio of $^{24}\text{Na}$ between corpuscles and plasma of equal weight
<i>Cat A</i> . . . . .	0.5	9.8
	1.1	10.4
	2.1	19.2
<i>Cat B</i> . . . . .	0.5	10.2
	1.5	18.6
	3.0	28.4
	4.5	32.9
	6.0	36.4

Sodium ions thus penetrate, though at a fairly slow rate only, into the corpuscles and the same applies to potassium ions, as found by us previously for the rabbit (HEVESY & HAHN, 1941) recently for the dog (see Table 17) and by NOONAN, FENN and HAEGE (1941) for the rat. NOONAN and his colleagues found that 1 hour after subcutaneous injection of labelled potassium about the same amount of  $^{42}\text{K}$  is present in 1 gm. of corpuscles of the rat as in 1 gm. of plasma.

As both sodium and potassium interchange between plasma and corpuscles, the great difference in the concentration ratio of potassium and sodium in the erythrocytes and the plasma, respectively, cannot be due to a non-permeability of the corpuscle membrane to free  $\text{Na}^+$  or free  $\text{K}^+$  ions. This consequence of the interchange experiments will be discussed in another paper in which further measurements on the rate of interchange of potassium will be communicated.

Table 17.

*Distribution of  $^{42}\text{K}$  between corpuscles and plasma of the dog at 37°. Length of experiment: 2 hours.*

No. of experiment	Percent of $^{42}\text{K}$ added present in the corpuscles	Percentage distribution ratio
1 . . . . .	15.0	20.9
2 . . . . .	14.1	19.6
3 . . . . .	12.9	18.1

### Interchange and Accumulation.

As we saw, the most direct measure of the hindrance which ions encounter when passing a phase boundary is the rate of interchange between labelled ions present in one phase and non-labelled ions present in the other phase. Since ions cannot pass a phase boundary without the simultaneous passage of an equivalent number of ions of opposite charge or by a replacement of the ions by an equivalent number of ions of the same charge, in all investigations except those in which the interchange of labelled and non-labelled ions of the same kind is investigated, we measure the resultant of the hindrance

of the phase boundary to two different ions. If sodium ions penetrate from one phase into the other simultaneously with ehloride ions, the rate of penetration of sodium chloride is  $\frac{2 u v}{u + v}$ , where  $u$  is the rate of interchange of  $\text{Na}^+$ , and  $v$  the rate of interchange of ehloride. Let us assume  $v$  to be 10 times larger than  $u$ , then the rate of penetration of the salt will be  $\frac{2 \cdot 10 \cdot 1}{11} = 1.9$  times the rate of interchange of  $\text{Na}^+$ , thus the

partnership of ehloride will accelerate the rate of movement of the sodium ions to about twice of its normal value. On the other hand, the speed of penetration of  $\text{Cl}^-$  will be reduced to about  $\frac{1}{5}$  of its normal value. It follows from the above equation that the rate of movement of an ion can only be accelerated to a restricted extent by its partnership with a rapidly moving ion, while the rate of movement of a rapid ion can be reduced very appreciably by a partnership with a slowly moving ion. If an ion which interchanges with a velocity of 1000 (relative units) moves in partnership with an ion which interchanges with a velocity of 1, the first mentioned ion will not penetrate with a velocity of 1000 from one phase into the other, but with a velocity of 2, only.

Somewhat different considerations apply to the rate of replacement of ions, for example, for the rate of replacement of some of the ehloride ions of the corpuscles by sulphate ions of the plasma. Such a replacement will take place if we increase the sulphate concentration (and correspondingly decrease the ehloride concentration) of the plasma. Since the rate of passage of the ehloride ions through the corpusele membrane is larger than the rate of passage of the sulphate ions, the passage of ehloride ions from the corpuseles into the plasma will not be exactly compensated by a migration of a corresponding number of sulphate ions in the opposite direction; however, a slight excess of ehloride ions will accumulate in the plasma. This accumulation will lead to the formation of a potential gradient which will accelerate the movement of the sulphate ions and slow down the movement of the ehloride ions. As a result of this process, the rate of replacement of ehloride ions by sulphate ions (and vice versa) will be

$$\frac{V_1 V_2}{V_1 - V_2} \log \text{nat} \frac{V_1}{V_2}$$

where  $V_1$  is the rate of interchange of chloride ions (with other chloride ions) and  $V_2$  is the rate of interchange of sulphate ions (with other sulphate ions).  $V_1$  and  $V_2$  are determined by adding isotopic indicators to one of the two phases. Assuming  $V_1 = 100$  and  $V_2 = 1$ , the rate of interchange works out to be 4.6; thus, the rate of interchange is mainly determined by the resistance of the corpuscle membrane to the slower sulphate ion. In the above consideration, in view of the slow migration of the cations through the corpuscle membrane, the influence of the movement of the cations on the rate of interchange of the anions was disregarded.

When discussing the rate of interchange of cations, for example the rate of replacement of some of the sodium ions of the corpuscles by potassium ions of the plasma which follows an increase in the potassium concentration (and a corresponding decrease of the sodium concentration) of the plasma, the influence of the movement of the anions can no longer be disregarded, this movement being in the case of some of the anions very rapid. The more intricate problem of the rate of interchange of ions in such cases will be discussed in an other paper.

We wish to express our hearty thanks to Professor NIELS BOHR for numerous facilities most kindly put at our disposal.

### Summary.

The red corpuscles contain much larger amounts of acid soluble phosphorus compounds than the plasma. The difference is only maintained as long as an active process, an alternative phosphorylation and dephosphorylation, takes place in the corpuscles, a process which was studied by measuring the rate of penetration of labelled phosphorus into the erythrocytes and the rate of incorporation of  $^{32}\text{P}$  into the acid soluble P compounds present in the corpuscles.

While labelled phosphate penetrates at about the same rate into the corpuscles of the human and the rabbit, it enters at a much slower rate the nucleated corpuscles of the hen and the frog.

The amount of labelled phosphate which penetrates into the corpuscles of the rabbit at  $0^\circ$  was found to make out about  $\frac{1}{14}$  of the amount found at  $37^\circ$ .



Incorporation of labelled phosphate into acid soluble P compounds, thus alternative dephosphorylation and phosphorylation, was found to go on in the blood hemolysate as well, though at a slower rate than in the intact corpuscles.

A lowering of the temperature from 37° to 0° reduces the amount of labelled P incorporated into organic P compounds of the hemolysate to  $\frac{1}{4}$ .

The addition of KCN to blood reduces the formation of organic P compounds in the corpuscle markedly.

The rate of penetration of phosphate into the corpuscles was also measured by accumulation experiments in which a part of the plasma chloride was replaced by phosphate and the amount of phosphate which left the plasma determined at different intervals.

The difference between the interchange of labelled and non-labelled ions, present in the plasma and the corpuscles respectively, and the accumulation of ions in the corpuscles after raising the ionic concentration of the plasma is discussed and it is shown that only interchange experiments supply a direct measure of the hindrance of a phase boundary to the passage of ions.

By using  $^{32}\text{P}$  and  $^{36}\text{Cl}$ , respectively, as indicators the percentage of plasma phosphate which penetrates per unit time into the corpuscles of the rabbit was found to be at least 100 times smaller than the percentage of plasma chloride penetrating into the corpuscles. The rate of penetration of sodium, using  $^{24}\text{Na}$  as a tracer, was found to be slower than the rate of intrusion of phosphate.

### References.

- ADLERSBERG, D., and J. GLASS: *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 1932. 165. 383.  
ATEN, A. H. W., and G. HEVESY: *Nature* 1938. 142. 871.  
—, D. Kgl. Danske Vidensk. Selsk. *Biol. Medd.* 1939. 14. 5.  
COHN, W. E., and E. T. COHN: *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.*, 1939. 41. 455.  
DIRKEN, M. N. J., and H. W. MOOK: *J. Physiol.* 1931. 73. 356.  
EGE, R.: *Studier over glukosens fordeling mellem plasmaet og de røde blodlegemer og nogle dermed sammanhørende problemer*, København 1919.  
HAHN, L., and G. HEVESY: *Mem. Carlsberg Lab.* 1938. 22. 188.  
HAHN, L., G. HEVESY and O. REBBE: *Biochem. J.* 1939. 33. 1549.  
HALPERN, L.: *J. Biol. Chem.* 1936. 114. 747.

- HEVESY, G., and L. HAHN: D. Kgl. Danske Vidensk. Selsk. Biol. Medd. 1940. 15. 7.
- , Ibidem 1941. 16. 1.
- IVERSEN, P.: Biochem. Z. 1921. 114. 297.
- LENNERSTRAND, A.: Ark. f. Kemi, Mineral. o. Geologi 1941. 14 A. 13. 68.
- NOONAN, T. R., W. C. FENN and L. HÆGE: Amer. J. Physiol. 1941. 132. 474.
- SJÖBERG, K.: Acta Physiol. Scand. 1940. 1. 125.
- SOLOMON, R. S., P. M. HALD and J. P. PETERS: J. Biol. Chem. 1940. 132. 723.
-

## Untersuchungen über die periphere Blutversorgung des Herzmuskels.

Von

LARS ENGSTRAND.

(Eingereicht am 25. Oktober 1941.)

---

Beim Studium der Blutversorgung des Herzens und dessen Regelung hat man wegen Mangel geeigneter Methoden lange nur wenige direkten Beobachtungen der Kapillaren machen können, sondern meistens indirekt Schlüsse über diese durch Bestimmungen des Coronarblutflusses gezogen.

Die meisten Autoren haben dabei am perfundierten Herzen bei konstantem (ANREP et al., 1926, 1927, 1931) sowie bei variierenden Coronararteriendruck (WIGGERS und COTTON, 1933, WIGGERS, GREEN, GREGG, 1935) eine systolische mehr oder minder ausgesprochene Reduktion des coronaren Blutflusses beobachtet. REIN, HOCHREIN (1931) verlegen dagegen die maximale Durchblutung auf die Systole.

Direkte Untersuchungen über das Verhältnis der Kapillaren zur Herzphase wurden während der letzten Jahre von JORES, VANOTTI, FOCK und SJÖSTRAND ausgeführt. Mittels Farbinjektion beziehungsweise Erythrocytfärbung stellten JORES (1928), FOCK (1933) und SJÖSTRAND (1935), VANOTTI (1936) das Kapillarsystem in Herzen dar, welche durch Ca-acetat und Nackenschlag (JORES, VANOTTI) sowie Dekapitation (SJÖSTRAND) in der Systole und Diastole zum Stehen gebracht worden waren. JORES und FOCK beobachteten eine starke Kompression der intramuralen Kapillaren während der Systole, während VANOTTI eine solche nicht feststellen konnte. SJÖSTRAND (1935) machte eine Anzahl quan-

titative Berechnungen über die kapillare Blutmenge des Herzmuskels während der Diastole bei Mäusen (dekapitierte Tiere).

Gegen die bisher verwandeten Methoden kann eingewendet werden, dass Farbstoffinjektion zur Darstellung des Kapillarnetzes im Herzen (JORES, FOCK) unsichere Resultate auf Grund ungleichmässiger Verteilung speziell in engen Kapillaren gibt (siehe auch SJÖSTRAND, 1934). Ca-acetat in den verwendeten Mengen bewirkt ausser extremer Herzkontraktion auch eine allgemeine Gefässwirkung (JORES, VANOTTI). Mit Erythrocytfärbung bekommt man eine richtige Wiedergabe des Kapillarnetzes aber veränderter kapillarer Tonus und Verschiebungen der Blutmenge innerhalb desselben sowohl bei diastolischen Herzstillstand nach Nackenschlag etc. (VANOTTI) sowie nach Dekapitation (SJÖSTRAND), worauf SJÖSTRAND in seinen Untersuchungen ebenfalls hingewiesen hat. Auch bei Fixierung und Einbettung entstehen auf Grund von Gewebeschrumpung gewisse Fehlerquellen.

### Eigene Untersuchungen.

Die Absicht der vorliegenden Untersuchungen war in erster Linie das Verhalten der kleineren Herzgefässe — Arterioli, Kapillaren — während der Systole zu studieren, in zweiter Linie eine Aufssung über das Verhalten der kapillaren Kontaktfläche und des Diffusionsabstandes im Herzmuskel unter variierenden physiologischen Bedingungen, speziell bei Frequenzsteigerung, zu erhalten. Es muss darauf hingewiesen werden dass die Grösse der intramuralen Zirkulation ebensowenig direkt aus diesen Versuchen herausgelesen werden kann wie Bestimmungen über den Coronarblutfluss an und für sich eine sichere Auffassung über die Grösse der intramuralen Zirkulation geben können. Im Verein mit den erwähnten Coronarvolum- und Druckbestimmungen scheinen diese Versuche doch ein vollständigeres Bild der intramuralen Zirkulation während der Systole sowie Auffassung über die kapillare Kontaktfläche und die Anpassung des Diffusionsabstandes für gewisse Arbeitsweisen zu geben.

### Methode.

Betreffs des Herzmuskels hat man die Möglichkeiten für intramurale Verschiebungen der Blutmenge d. h. Leerung des Kapillarsystemes nach dem Fall des Aorta- und Coronarblutdruckes bei Dekapitation

nicht studiert. Um zu erforschen, in wie weit Dekapitation als Todesart hier anwendbar war, wurde also ein schnelleres Stillstehen des Herzens bei intakter Zirkulation und Herzmuskel gefordert. Die Altmannsche Gefriervakuumtechnik schien zu diesem Zweck geeignet. Mit dieser Technik wird ausser einem schnellen Töten auch eine Fixierung ohne Gewebsbeschrumpfung erreicht. (Sjöstrand, F. und T., 1938).

Am geeignetsten zum Gefrieren waren weisse Mäuse mit einem Gewicht von 8—15 gr. Die Gefrier- und Fixierungstechnik entspricht den von F. und T. Sjöstrand (1938) beschriebenen. Vor der Einbettung in Paraffin wird als Wegleitung bei der histologischen Schnittung eine dünne Nadel durch das Kammarseptum in der Richtung von der Base zum Apex eingesetzt, nachdem die Vorhöfe abgetragen worden sind. Das Herz wird quer zerschnitten, montiert und blutkörpergefärbt nach T. Sjöstrands Methode mit Orthotoloidin-Wasserstoffsuperoxyd (Sjöstrand, 1934). Zur Kontrolle der Querschnitte wurde eine Anzahl Schnitte von jedem Herzen mit Heidenhains Hämatoxylin gefärbt; zur Berechnung der Anzahl der Blutkörperchen wurden 8  $\mu$  Schnitte angewandt, worin 36 Mikrofelder in der linken Kammer, in einem Teil der Präparate auch in der rechten Kammer sowie im Kammerseptum bei einer Vergrösserung von 360 mal gezählt wurden. Um zu verhindern, dass eine Auswahl der Gefässgebiete hierbei vorkam, wurden 3 bei einanderliegende Mikrofelder gerechnet, die durch Verschiebung des Präparates erhalten wurden, wobei nicht mehr als ein Mikrofeld des Präparates bei jeder Einstellung überblickt werden konnte. Im allgemeinen wurden 12 bis 15 Schnitte per Herz in variierendem Abstand von der Herzbasis gerechnet. Die Rechnung der Blutkörperchen wurde nur in der Länge nach geschnittener Muskulatur, im mittelsten zirkulären Muskellager, vorgenommen.

Um im selben Muskellager die Kapillärenanzahl pro  $\text{mm}^2$  berechnen zu können, wurde das Herz, nachdem eine Anzahl Querschnitte ausgeführt worden waren, in Paraffin umgeben und der Länge nach in Serien zerschnitten. Dabei erhielt man also das mittelste zirkuläre Muskellager querzerschnitten und in diesem wurde die Anzahl offene Kapillaren pro  $\text{mm}^2$  in blutkörpergefärbten 20  $\mu$  Schnitten (36 Felder in jedem Herzen) gerechnet.

Bei Gefrieren von intakten Tieren (10 Tiere) wurden Blutmengenwerte von  $841,000 \pm 18,500$  erhalten. Da indessen eine ausgesprochene Stase in Kapillaren und Venen beobachtet wurde, scheint die Gefrierzeit (in diesen Versuchen sicherlich mehrere Sekunden) von erheblicher Bedeutung zu sein und wurde deshalb durch Freilegen von dem Herzen unter künstliche Atmung (Trachealkanüle) in den folgenden Versuchen verkürzt. Die Methode ergab Blutmengenwerte (in Mittel von 10 Tieren) von  $575,000 \pm 35,900$ . Obgleich die Methode eine möglichst kurze und unveränderliche Gefrierzeit bei intakter Zirkulation ergab, war ja ein gewisser unphysiologischer Zustand vorhanden.

Werden danach Tiere dekapiert, an welchen das Herz wie oben freigelegt wurde und Fixierung in flüssiger Luft geschehen ist nach dem das Herz stehen geblieben ist, erhält man Blutmengenwerte von

ungefähr  $415,000 \pm 22,500$  (10 Tiere). Diese stimmen mit den entsprechenden Werten von SJÖSTRANDS Normaltieren überein. ( $350-400,000/\text{mm}^3$ ). Da diese dekapitierten Tiere mit denen in obenstehender Gruppe (freigelegte Herzen) direkt vergleichbar sind, scheint daraus hervorzugehen, dass eine deutliche Verminderung oder Leerung des Blutes aus den Herzkapillaren nach der Dekapitation geschieht.

Diese Resultate stellen die Forderung an eine Methodik für Studien der Herzkapillaren, die eine *schnelle Fixierung des Herzens mit gleichzeitigem, schnellst möglichem Abbrechen der Zirkulation* gibt bei Tieren, an welchen keine Eingriffe vorher vorgenommen worden waren. Zu diesem Zweck wurde eine Sehere mit 4 schneidenden Klingen konstruiert (s. h. Fig. 1).

Es zeigte sich bei Versuchen mit dieser Sehere, dass, als das Tier unter Pernoktonnarkose in derselben angebracht wurde und die Messer über der Herzpartie des Thorax eingestellt wurden, man beim Schneiden in dem meisten Fällen das Herz unmittelbar freigelegt bekam. (s. h. Fig. 2). Die Technik bei allen nachfolgenden Versuchen war also die, dass die Sehere oder das Makrotom mit dem in demselben festgespannten Tiere in einem Dewarsgefäß mit fliessender Luft niedergeführt wurde. Das Schneiden geschah in demselben Augenblick, in dem das Tier niedergesenkt wurde. Die grossen Messerklingen der Sehere, die in unmittelbaren Kontakt mit den dem Herzen zunächst liegenden Geweben kommen, tragen sicherlich zu einem grossen Teil zu einem Schnellen Gefrieren bei.

Die Blutmengenwerte, die man auf diese Weise erhielt, lagen bei ungefähr  $585,000 \pm 12,400$ , also übereinstimmend mit den bei künstlicher Atmung und Freilegung des Herzens erhaltenen. Wahrscheinlich kommen diese Blutmengenwerte den physiologischen am nächsten.

Im Augenblick des Schneidens werden Gefäss- und Nervenverbindungen des Herzens abgeschnitten, und Blutdruckänderungen in den grossen herznahen Gefässen wirken nicht auf die Durchblutung des Herzens ein. Da das Schneiden zugleich mit dem Gefrieren geschieht, können intramurale Verschiebungen der Blutmenge mit allergrösster Wahrscheinlichkeit nicht vorkommen und zwar deswegen weil sowohl zuführende Arterienstämme wie wegführende Venen durch ihre äusserliche Lage und Dünnwandigkeit zuerst — innerhalb eines wahrscheinlichen Zeitraumes von  $1/10$  Sekunde oder weniger, gefrieren. (Maximale Wandstärke von  $500-600 \mu$ , und Herzgewicht von  $350-380 \text{ mg}$ ).

Wahrscheinlich bringt das Gefrieren eine Reizung des Herzmuskels mit sich, da sämtliche Herzen mit dieser Methode in der Systole fixiert werden. Möglicherweise ist diese Systole kräftiger als normalerweise — dagegen spricht indessen, dass sich in den meisten Herzen eine, wenngleich geringe, intraventriculäre Blutmenge gefunden hat — aber die Voraussetzung für eine Rückwirkung auf die intramurale Blutmenge im Augenblick des Gefrierens fehlt aus Gründen, die oben angegeben wurden. Das Herz hat von dem Augenblick, wo die Klingen des Makrotoms Gefässe und Nervenstrenge abschneiden bis zum Augenblick des Gefrierens sicherlich keine Zeit, einen Herzschlag auszuführen.



Fig. 1.



Fig. 2. Lage des Herzen nach dem Schneiden.

### Beschreibung der Präparate.

Die mit dieser Methode erhaltenen Herzpräparate befinden sich zum überwiegenden Teile in der Systole. Sämtliche Muskellager zeigen hierbei gute Kapillarisation. Die Blutkörperchen sind in den Kapillaren deformiert, was auf erhöhten Kapillartonus oder komprimierende Einwirkung der Herzmuskelfasern deutet. Eine Differenz in der Blutmenge zwischen der linken und der rechten Kammer und dem Kammerseptum konnte nicht nachgewiesen werden. Im voll kontrahierten Herzen wurden eine sehr kleine Anzahl offener kapillare quer- oder schräggehender Anastomosen oder quergehenden Venen beobachtet, wie auch VANOTTI (1936) beschrieben hat. In Herzen, die mit einer geringeren Blutmenge in den Ventrikeln, entsprechend dem Anfang der Systole oder Diastole, fixiert waren, wurden eine variierende Anzahl geöffneter kapillarer quergehender Anastomosen beobachtet.

*Die intramurale Zirkulation während der Systole:* Hier vorliegende Resultate, die eine reiche Kapillarisation während der Systole aufweisen, machen unter Berücksichtigung von oben erwähnten Coronarvolum — und Druckregistrierungen (ANREP u. a., WIGGERS, u. a.) eine kapillare systolische Durchblutung sowohl unter isometrischer wie isotoner Kontraktionen (Vgl. GREEN, GREGG und WIGGERS, 1935) höchst wahrscheinlich.

## Die Kapillarisierung des Herzmuskels bei verschiedenen Schlagfrequenzen.

Beim Studium derselben wurde die Frequenz mit Elektrokardiogramm registriert und zum Erhalten verschiedener Schlagfrequenzen wurde Pernoktonnarkose von variierender Tiefe sowie wache Tiere in verschiedenen Excitationsstadien verwandt.

Die Narkose nach subkutaner Injektion von  $\frac{1}{2}$ —1 mg per 10 g Körpergewicht war oberflächlich oder mitteltief, die letztgenannte entsprechend dem Narkosestadium IV nach SCHOEN, d. h. vollständige passive Seitenlage und Reaktionslosigkeit auf Schmerzreizung. Diese trat nach etwa 15 bis 25 Minuten ein. Der Effekt des Pernoktonnarkose in Form von Senkung von den Atmungs- und Herzfrequenzen, die einander folgten, war bei Mäusen schon nach 10 Minuten deutlich. REMÉ, LERCHE und KUCKULIES (1937) sahen dagegen erst bei der terminalen Atmung Beeinflussung der Herzfrequenz. Irgendeine Beeinflussung vom peripheren Gefässtonus bei Pernoktonnarkose (oberflächlich bis mitteltief) ist nach SJÖSTRAND (1935) (Leber und Niere) nicht vorhanden.

Unmittelbar vor dem Schneiden und Gefrieren auf gewöhnliche Weise wurde die Schlagfrequenz bei mehreren Tieren durch Aufnahme des Ekg registriert. Die Elektroden wurden in Form von Nadeln in Ableitung II subkutan angebracht und das Tier lag eine kurze Zeit mit diesen, bevor das Ekg genommen wurde. Approximativ ( $\pm 50$  Schlag/Min.) ist die Herzfrequenz bei einem Teil der Tiere aus Narkosezeit und Dosis sowie das Verhalten der Stellreflexe nach einem Vergleich mit Tieren, wo Narkosezeit, Dosis und Herzfrequenz bekannt waren, berechnet worden.

Folgende Resultate für die kapillare Blutmenge und die Kapillaranzahl im mittelsten zirkulären Muskellager wurden erhalten:



Tabelle I.

*Blutkörperchenanzahl/mm<sup>3</sup> Herzmuskel oder Variationen des totalen Kapillarquerschnittes und der Kapillaranzahl im mittelsten zirkulären Muskellager mit variierender Herzfrequenz, bei Excitation, verschiedener Narkosetiefe. — Gewicht der Tiere 12 gr.*

Tier Nr	Zustand	Herz- frequenz per Min.	Blutkörp.anzahl /mm <sup>3</sup> = totaler Kapillarquer- schn. mm <sup>2</sup>	Anzahl offene Kapill. /mm <sup>2</sup>	Relat. kapill. Kontakt oberfl.
155,	wach; excitiert Senföl am Bauch	828	624,300 ± 18,100	4,770 ± 100	193,000
154,	wach; excitiert Senföl am Bauch	780	632,400 ± 13,300	4,630 ± 57	192,000
156,	wach; excitiert Senföl am Bauch	760	681,800 ± 13,600	4,620 ± 70	199,000
146	wach; excitiert	691	605,000 ± 13,600	4,220 ± 52	179,000
154	„ ; „	691	— —	— —	—
144	„ ; aufgespannt 3 Min.	613	612,000 ± 11,800	3,940 ± 54	174,000
135	„ ; excitiert	600—700	687,300 ± 13,100	4,160 ± 71	190,000
107	„ ; „	600—700	600,200 ± 16,100	3,910 ± 60	172,000
105	„ ; aufgesp. 3 Min.	550—650	502,900 ± 15,300	— —	—
106	„ ; aufgesp. 3 Min.	550—650	550,700 ± 12,700	— —	—
116	1/2 mg Pn. 10 Min; Vorder- u. Hinter- körper in Seiten- lage; Kopf in Nor- malstellung	550—650	619,000 ± 14,300	— —	—
128	1/2 mg Pn., 12 Min; im übrigen wie vorherg.	550—650	606,600 ± 10,000	3,860 ± 55	171,000
100	1/2 mg. Pn., 10 Min. Seitenlage	450—550	587,900 ± 16,900	— —	—
101	1/2 mg Pn., 15 Min. Seitenlage	350—400	574,000 ± 15,000	— —	—
118	0.8 mg Pn.; 15 Min; Stlg.	380	587,000 ± 14,100	3,010 ± 49	150,000
123	0.8 mg Pn.; 8 Min; Stlg.	350—400	582,000 ± 10,700	2,860 ± 65	145,000
120	0.8 mg. Pn.; 15 Min; Stlg.	300—400	506,700 ± 15,200	2,590 ± 51	128,000
138	0.8 mg. Pn.; 35 Min; Stlg.	250—300	631,400 ± 12,600	2,660 ± 53	145,000
141	0.8 mg Pn.; 30 Min; Stlg.	200	493,000 ± 13,600	3,060 ± 73	137,000
142	0.8 mg. Pn.; 35 Min; Stlg.	220	535,800 ± 14,000	2,830 ± 66	155,000
109	1 mg Pn.; 15 Min; 0 Schmrfl.	150—200	612,600 ± 11,600	2,460 ± 56	141,000
102	1.2 mg Pn.; 10 Min; Stlg. 0 Schmrfl.	150—250	458,000 ± 14,200	— —	—
92	1.5 mg Pn.; 20 Min; Stlg. 0 Schmrfl.	150—250	534,300 ± 16,300	— —	—

Tier Nr	Zustand	Herzfrequenz per Min.	Blutkörperchenanzahl/mm <sup>3</sup> = totaler Kapillarquerschn. mm <sup>2</sup>	Anzahl offene Kapill. /mm <sup>2</sup>	Relat. kapill. Kontakt oberfl.
96	1.5 mg Pn.; 25 Min; Stlg. 0 Schmrfl.	150—250	553,600 ± 13,900	— —	—
94	1.5 mg Pn.; 45 Min; Stlg. 0 Schmrfl.	100—200	525,400 ± 14,800	— —	—
98	1.5 mg Pn.; 45 Min; Stlg. 0 Schmrfl.	100—200	537,800 ± 14,000	— —	—
113	1.5 mg Pn.; 1 Std; Stlg. 0 Schmrfl. Cyanose, peripher kalt.	50—100	551,600 ± 14,000	1,910 ± 48	115,000
111	1.5 mg Pn.; 30 Min Stlg. 0 Schmrfl. Cyanose, peripher kalt.	50—150	585,000 ± 13,200	2,570 ± 73	138,000
99	1.5 mg Pn.; 1 Std; Stlg. 0 Schmrfl. Cyanose	10—50	658,600 ± 16,000	—	—

### Einwirkung von Azetylcholinjodid auf die Kapillaren des Herzmuskels.

Der Effekt von grossen Dosen Azetylcholinjodid (intravenös) auf Kapillarisation und Herzfrequenz wurde studiert.

Tabelle II.

Blutkörperchenanzahl/mm<sup>3</sup> Herzmuskel und Kapillaranzahl/mm<sup>2</sup> (mit-  
telstes zirkuläres Muskellager) bei intravenöser Injektion von grossen  
Dosen Azetylcholin.

Tier Nr	Mg Pn. subcut.	Narkosezeit und Tiefe	AcCh in mg	Wirkungszeit	Pregu. vor d. Injekt.	Pregu. beim Gefr.	Blutkörperchenanzahl/mm <sup>3</sup>	Anzahl offene Kapill. /mm <sup>2</sup>
145	0.8	Pass. Seitlg. 55 + 10 Min.	1	10 m.	212/M.	48/M.	970,500 ± 18,100	—
148	1.0	47 + 8 Min.	1	8	286	255	1,100,000 ± 16,900	5,460 ± 60
149	1.0	59 + 2 „	2	2	275	70	905,600 ± 14,300	5,750 ± 70
150	1.0	36 + 6 „	1	6	428	304	879,000 ± 20,100	5,100 ± 50
151	1.0	28 + 5 „	1	5	358	63	893,000 ± 17,300	5,500 ± 40
152	1.0	55 + 10 „	1	10	163	79	—	—
153	1.0	65 + 11 „	3	11	271	109	1,028,000 ± 15,500	5,530 ± 80
155 <sub>2</sub>	wach	—	1 + 1 mg subk.	10	600	188	729,000 ± 16,100	5,320 ± 90
150 <sub>2</sub>	„	—	1 + 1 mg subk.	13	714	120	786,000 ± 19,500	4,600 ± 40
147	„	—	1	5	609	372	—	—

Eine kräftige Zunahme der intramuralen Blutmenge, der Kapillaranzahl und der Kapillarkontaktfläche wurde erhalten. Die Zunahme an Kapillarblutmenge belief sich auf 60—100 % und an Kapillaranzahl auf 50—80 % im Vergleich mit mit Pernokton betäubten Tieren mit derselben Herzfrequenz, die nicht mit AcCh gespritzt wurden. Eine deutliche und variierende Senkung der Herzfrequenz wurde erhalten. Dieser unzweifelhafte Effekt auf die Kapillaren wurde also in allen Versuchen von einem negativen chronotropen Effekt begleitet.

### Quantitative Berechnungen von Kapillarquerschnitt, relativer kapillarer Kontaktfläche und Diffusionsabstand.

Vorausgesetzt dass die Verteilung zwischen Plasma und Blutkörperchen bei verschiedenen Kapillarweiten immer dieselbe ist, was sicherlich approximativ gilt, stellt die Anzahl Blutkörperchen/mm<sup>3</sup> das für den Augenblick fixierte Blutvolumen dar. Die Blutkörperchenanzahl/mm<sup>3</sup> gibt auch ein relatives Mass für den totalen Kapillarquerschnitt, da die Kapillarlänge unveränderlich ist.

Aus dem totalen Kapillarquerschnitt (B) und der Kapillaranzahl (C) kann man die relative kapillare Kontaktfläche/mm<sup>2</sup> berechnen.

Relative kapillare Kontaktfläche =  $2\pi \sqrt{B \cdot C}$  (Kapillarlänge = 1).

Der Diffusionsabstand wird aus Kapillaranzahl/mm<sup>2</sup> und Kapillarweite berechnet.

### Resultate.

Von Tabell 1 geht hervor, dass mit steigender Herzfrequenz — unter verschiedenen Stadien von Pernoktonnarkose und unter Excitation — eine deutliche, kontinuierliche Zunahme der Kapillaranzahl/mm<sup>2</sup> und der Kapillarkontaktfläche/mm<sup>2</sup> stattfindet. Zugleich zeigt der kapillare totale Querschnitt im Vergleich mit früheren Faktoren eine relativ geringe Zunahme innerhalb des Frequenzgebietes 200 bis 828. (Die statistischen Berechnungen wurden nach den von G. v. REIS und F. SJÖSTRAND (1940) verwendeten Formeln ausgeführt.)

Ausserdem wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der Länge der diastolischen Herzphase (aus Ekg) sowie längsten Diffusionsabstand und der kapillaren Kontraktfläche, innerhalb des Frequenzgebietes 380 bis 828, entsprechend Diastolendauer von

0.13 bis 0.06 Sekunde, beobachtet, während dagegen ein ebensolcher Zusammenhang zwischen der Länge des ganzen Herzzyklus und den erwähnten Faktoren nicht festgestellt werden konnte. (Fig. 3.)

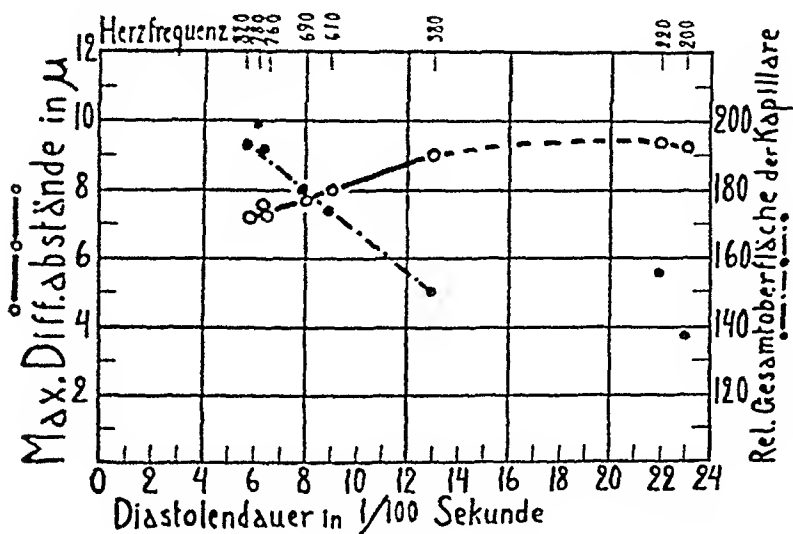


Fig. 3. Zusammenhang zwischen der Länge der diastolischen Herzphase (aus Ekg) und dem längsten interkapillaren Diffusionsabstand und der kapillare Kontaktfläche.

### Besprechung.

Eine eventuelle Minutvolumverminderung dürfte innerhalb des Frequenzbezirkes 500 bis 350 sich nicht auf mehr als was der Senkung der Frequenz entspricht, belaufen. (Vgl. BÜMM, 1936, Pernoktonarkose). Die Ruhewert des Minutvolumen liegt bei Frequenzen von 450—500. Von 400 bis 200 unter tieferer Pernoktonarkose, ist die Grösse der Minutvolumverminderung wahrseheinlich etwas stärker. (Bei Frequenzen unter 100/Minute — periphere Zirkulationsinsuffizienz, Respirationsinsuffizienz und Kapillardilatation im Herzmuskel als Zeichen von Anoxämie). Bei wachen Tieren in verschiedenen Excitationsstadien und in Körperruhe geschieht mit der Steigerung der Frequenz eine Zunahme des Minutvolumens, die sich doch, wie experimentelle Untersuchungen gezeigt haben (GROLLMAN, 1935, REIN, 1931) gewöhnlich nicht auf mehr beläuft, als was der Zunahme der Herzfrequenz mit unverändertem Schlagvolumen entspricht.

Die diastolische Phase, unter welcher die oxidativen Prozesse hauptsächlich geschehen, wird bedeutend mehr als die systolische

bei Zunahme der Frequenz verkürzt. Die oxidativen Prozesse im Herzmuskel müssen sicherlich unter einem Herzzyklus abgeschlossen sein, da ja niemals unter mässigen Arbeiten eine nachweisbare Sauerstoffschuld entsteht und Milchsäure im Coronarvenenblut als Zeichen für unzureichende Oxydation kann erst bei Sauerstoffsättigungsgraden im Blute unter 25 % nach RUHL und THADDEA (1934, 1939) (Bestimmungen an innervierten Herzlungenpräparate) nachgewiesen werden.

Man hat Ursache anzunehmen, dass auf Grund der reichen Kapillarsierung die Durchblutung unter Systole in dieser Materiale bei steigender Frequenz gut ist, weswegen die Herzarbeit sicherlich überwiegend isoton ist. (Vgl. WIGGERS, GREEN, GREGG, 1935). Da das Schlagvolumen bei Frequenzsteigerung von 450 (oder 380) bis 828 unveränderlich oder vermindert und weiter der Mittelblutdruck in der Aorta in geringem Grade erhöht sein dürfte, ist es wahrscheinlich, dass die Herzarbeit pro Herzschlag und der diesem entsprechende  $O_2$ -Verbrauch pro Herzschlag entweder unverändert oder etwas erhöht ist, im letzten Falle doch nicht in direkter Proportionalität zur Frequenzsteigerung, sondern minder, entsprechend eine kleine und langsame Erhöhung (maximal 15—20 % nach REIN (1931) des Mittelblutdruckes.

Die kapillare Anpassung mit Verkürzung des Diffusionsabstandes und Zunahme der kapillaren Kontaktfläche dürfte deshalb in der Hauptsache den Zweck haben, eine schnellere  $O_2$ -Diffusion, entsprechend der Verkürzung der diastolischen Herzphase, bei steigender Herzfrequenz zu ermöglichen. (Linearer Zusammenhang zwischen längsten Diffusionsabstand, Kapillarkontaktfläche auf der einen Seite sowie diastolischer Herzphase auf der anderen, zwischen den Frequenzen 380 bis 820). Fig. 3.

Der auf Grund einer eventuell erhöhten Herzarbeit per Herzschlag erhöhte  $O_2$ -Bedarf wird durch vermehrte Coronardurchblutung sowie eine gesteigerte  $O_2$ -Ausnutzung sichergestellt.

Es ist ja beachtenswert, dass *eine vermehrte Durchblutung* (ausgelöst durch Bainbridgereflexe nach GOLLWITZER-MEIER u. a. (1938), sowie erwähnte *Vergrösserung der kapillaren Kontaktfläche* mit daraus folgender gesteigerter Sauerstoffausnutzung bei Vergleich zwischen Frequenzen 400 und 800 und entsprechender Arbeitssteigerung per Herzschlag einen erhöhten Sauerstoffverbrauch, der sich *auf weit mehr als 20 %* beläuft, sicherstellen kann. (Also die maximale Arbeitssteigerung pro Herzschlag auf Grund von erhöhtem Mittelblutdruck in der Aorta im Frequenzgebiet 400—800). Die

Erklärung für dieses Verhalten kann vielleicht in dem von GOLLWITZER-MEIER u. a. (1938) beschriebenen *spezifisch energetischen Effekt bei Sympaticusreizung* liegen. Unter erwähnten Bedingungen (Frequenzsteigerung, isotone Herzarbeit) liegt wahrscheinlich gemäss GOLLWITZER-MEIER (1938) eine Verminderung des Wirkungsgrades und ausserdem nach EVANS (1913, 1939) eine Steigerung des RQ vor. (Erhöhte KH-Umsetzung im Herzmuskel.)

Eine Vergrösserung der kapillaren Kontaktfläche allein ohne gleichzeitige Verkürzung des Diffusionsabstandes ist nicht möglich, da diese Faktoren ja mit einander korreliert sind. Die kapillare Distribution soll auch *geringst möglichen Strömungswiderstand* geben — also bei Vergrösserung der kapillaren Kontaktfläche gleichzeitige Vergrösserung des totalen *Kapillarquerschnittes* (in diesem Materiale ca 10 % bei Frequenzsteigerung von 400 bis 800).

Die schnellere Herzaktion fordert im Vergleich zu der langsameren *bei gleichem  $O_2$ -Verbrauch per Herzschlag* eine Verminderung des Diffusionsabstandes und eine Vergrösserung der kapillaren Kontaktfläche. Diese Anpassung folgt der von KROGH (1922) hergeleiteten Formeln für die  $O_2$ -Diffusion.

*Die kapillare Distribution soll also:*

1) abgepasst sein für die  $O_2$ -Diffusion mit dem Streben nach grösstmöglicher kapillarer Kontaktfläche und grösstem Ausnutzungsgrad. Bei höheren Frequenzen wahrscheinlich eine lineare Anpassung zwischen Diffusionsabstand, Kapillarkontaktfläche und Länge der diastolischen Herzphase. Zugleich

2) geringst möglichen Strömungswiderstand geben.

### Zusammenfassung.

1. Eine Methode ist ausgearbeitet worden zur möglichst schnellen Fixierung der Blutbahnen im Herzmuskel, die quantitative kapillare Studien möglich macht.

2. Eine intramurale Durchblutung scheint unter der Systole vor sich zu gehen, doch unter erhöhtem Widerstand, was hauptsächlich auf der Kompression der quergehenden kapillaren Anastomosen und Venen beruht.

3. Bei Variation der Herzfrequenz von 380 zu 820 stellte sich heraus, dass linearer Zusammenhang zwischen der kapillaren Kontaktfläche und dem längsten Diffusionsabstand auf der einen Seite und der Länge der diastolischen Herzphase auf der anderen herrscht.

4. Azetylcholin in intravenöser Injektion ergab in grosser Dosen mit Frequenzsenkung eine starke Vergrösserung von Kapillarquerschnitt und Kapillaranzahl bei wachen und mit Pernokton betäubten Tieren.

5. Pernokton bewirkt nach subkutaner Injektion erst bei tiefer Narkose, im Stadium von Respirations- und periphere Zirkulationsinsuffizienz, eine deutliche Dilatation der Herzarterioli und Kapillaren.

### Literaturverzeichnis.

- ANREP, G. V., J. SEGALL: J. Physiol. 1926. 61. 215.  
 ANREP, G. V., J. C. DAVIS und E. VOLHARD: Ebenda. 1931. 73. 405.  
 ANREP, G. V. und J. SEGALL: Heart, 1926. 13. 239.  
 ANREP, G. V. und H. HÄUSLER: J. Physiol. 1929. 65. 357.  
 ANREP, G. V., A. BLALOCK und M. HAMMOUDA: Ebenda 1929. 67. 87.  
 BUMM, R.: Ergebn. Chir. Orthopäd. 1936. 29. 397.  
 CONDORELLI, L., Ergebn. Kreislaufforsch. 1933. 3. 32.  
 EVANS, C. L. und E. H. STARLING: J. Physiol. 1913. 46. 413.  
 EVANS, C. L.: J. Edinburgh Med. 1939. 46. 733.  
 FOCK, H.: Über Cyanose des Herzens. Inaug. dissert. Berlin 1933.  
 GOLLWITZER-MEIER, KL., CHR. KROETZ und E. KRUGER: Pflüg. Arch. ges. Physiol. 1938. 240. 263.  
 GOLLWITZER-MEIER, KL. und E. KRUGER: Ebenda 1938. 240. 89.  
 GOLLWITZER-MEIER, KL.: Pflüg. Arch. ges. Physiol. 1939. 242. 691.  
 GREEN, H. D., D. E. GREGG und C. J. WIGGERS: Amer. J. Physiol. 1935. 112. 627. 362.  
 GREGG, D. E.: Ebenda 1937. 119. 580.  
 GROLLMAN, A.: Schlagvolumen und Zeitvolumen des gesunden und kranken Menschen. Dresden und Leipzig, 1935.  
 HOCHREIN, M., W. GROS: Arch. exp. Path. Pharmak. 1931. 160. 66.  
 HOCHREIN, M., J. KELLER und R. MANCHE: Ebenda 1930. 151. 146.  
 JORES, A.: Z. es. exp. Med. 1928. 59. 172.  
 KROGH, A.: Anatomie und Physiologie der Kapillaren, Berlin 1929.  
 REIN, H.: Z. Biol. 1931. 92. 101.  
 REIN, H.: Ber. ges. Physiol. 1928. 42. 522.  
 REIS, G. v., F. SJÖSTRAND: Acta physiol. scand. 1940. 2. 189.  
 REMÉ, H., E. LERCHE und G. KUCKULIES: Dtsch. Z. Chir. 1936. 248. 366.  
 RUHL, A. und S. THADDEA: Klin. Wschr. 1934. 13. 29.  
 RUHL, A. und S. THADDEA: Arch. exp. path. pharmak. 1939. 191. 438.  
 SJÖSTRAND, T.: Skand. Arch. Physiol. 1935. suppl. 71.  
 SJÖSTRAND, F., T. SJÖSTRAND: Ebenda 1938. 79. 156.  
 SPALTEHOLZ, W.: Die Arterien der Herzwand, Leipzig 1924.  
 VANOTTI, A.: Z. ges. exp. Medd. 1936. 99. 158.  
 VOIGT, H. W.: Schmerz-Narkose-Anästhesie, 1938. 2. 44.  
 WIGGERS, C. J. und J. COTTON: Amer. J. Physiol. 1933. 106. 9. 597.  
 WIGGERS, C. und J. R. JOHNSON: Ebenda. 1937. 118. 38.

## The Physical Calculation of the Cardiac Output and its Error Sources.

By

A. APÉRIA.

(Received 11 November 1941.)

---

### Introduction.

The exact fundamental equations in hydrodynamics, can, as is known, only in a few extremely simple cases be completely integrated. Otherwise we must be content with more or less good approximate solutions and even in this we are not always successful.

The exact conditions concerning hemodynamics are specially difficult. We must in this case, among the rest, take into consideration also the elastic forces. Consequently we must fall back on rather far-reaching hypothetical simplifications, if we want to arrive at available theoretical results. But then the question is raised each time regarding the results based on these simplifications, whether they can, at least to a certain extent, be sufficiently verified by experiments.

We can reduce the practically unavoidable hypothetical simplifications to an extreme limit. In hemodynamics we can see such a limit in the quantitative air-chamber theory, which FRANK has developed instead of the earlier qualitative ones, which were started by HALES and WEBER. It is significant therefore to examine even this extreme theory on its most important as well as abstract and practical consequences (cf. APÉRIA 1940, part I.). We come then in certain important points to quantitative results, which no longer correspond even to the modest requirements in clinical practice. Above all this is the case with reference to the physical estimate of the cardiac output. The deviations arising between the calculated results and the



experimental control become often clearly too great. We must then try to replace in the original theory the extreme simplifications in question by higher degrees of approximation as far as possible (cp. APÉRIA, part II). Every definite maintaining of the earlier degree of approximation must, at all events, sooner or later yield to the demands of experience. The artificial supplementary hypothesis often existing in literature and foreign to hydrodynamics can then not save the first degree of approximation in the theory.

As a possible control with regard to the practical applicability of a physical stroke volume formula on human beings we have at present only the gas analytical method. This procedure, however, has not usually been employed by the originators of the earlier formulae mentioned. We can only so explain the fact, that the noticeable corresponding deviations, especially in old people and in hypertensive subjects have been relatively late in systematically being pointed out (APÉRIA 1940, cp. also BAZETT 1939). Independently of these statements DEPPE and WETTERER (1939) found similar deviations in connection with experiments on animals even at normal pressure conditions. The question then arises if it is possible, on the whole, to develop FRANK's formula of the air-chamber theory so far, that a relatively general agreement could be obtained between deduction and practice.

The author has given in a previous note (1941) a formula for basal conditions, the practical use of which could upon the whole be proved on 24 cases, where gasanalytical control has been carried out. Before a more detailed theoretical explanation of the method will be given below, 56 new cases may be noted. A comparison has there likewise been carried out between the stroke volume values obtained with formula (8) in the mentioned note (formula 1 below) and those, which have been obtained by acetylene. The cases represented are naturally not chosen in any way except that among them there are many cases of hypertension and in several tachycardia where the formulae proposed earlier have been shown to be particularly defective. Conformity in such cases has now been considerably improved.

On the use of the new formula there are, as is to be expected, sometimes considerable deviations from the gasanalytical values. We must then try to indicate the reasons by which the deviations between theory and practice above all depend when using the new formula. It is a matter of fact, that such deviations constitute very unpleasant possibilities for the clinical needs in practice. It will be shown that beside some too great simplifications in the theory itself, the want of accuracy of measurement for the most important magnitudes here in question is the cause for these deviations with regard to the physical calculation of the cardiac output. It is perhaps therefore of interest to look over in this connection once again systematically the sources of the corresponding errors. In conjunction herewith the corresponding theoretical statements in literature will be mentioned, at least, in certain directions. Beyond these statements the criticism will also be taken into consideration which DEPPE on one side and on

the other WETZLER and THAUER have developed on some points of an earlier paper (1940) by the author. On either side, the theoretical assumptions from which these authors start are, unfortunately, in essentials not correct.

By means of renewed quantitative investigation as to the sources of error in FRANK's theory the necessity will again be shown of passing this theory to higher theoretical degrees of approximation.

### On the Author's Stroke Volume Formula.

The stroke-volume formula mentioned in the introduction runs as follows

$$(1) \quad V_s, \Delta_{br} = \frac{\Delta_{br} Q L}{\rho c^2} \cdot \frac{T}{T_n}.$$

$V_s, \Delta_{br}$  signifies here the physically calculated stroke volume,  $\Delta_{br}$  the blood pressure amplitude measured at the brachial artery,  $Q$  the cross section of aorta ascendens,  $L$  the uncorrected length of the air-chamber,  $\rho$  the density of the blood,  $c$  the pulse wave velocity,  $T$  the duration of the pulse and  $T_n$  the "normal period time". This formula has been obtained by means of simple calculations and by using some statistical blood-pressure data (APÉRIA, 1941) from the following theoretical formula:

$$(2) \quad V_{s,\gamma} = \frac{k\gamma Q L F}{\rho c^2} \cdot \frac{D}{D_n}.$$

$k$  indicates the ratio between the mean velocity and the axial velocity in a cross section,  $\gamma$  the diastolic relative pressure-fall intensity,  $F$  the pressure area for the pulse period  $T$ ,  $Q$ ,  $L$ ,  $\rho$  and  $c$  as before,  $D$  the diastolic time and  $D_n$  the "normal" diastolic time. This relation deviates from those existing in the literature in several ways. The following statement will show the explanation for these deviations. First, however, the table already mentioned for 56 new cases may be given, calculated on the formula (1).  $V_s$  means the stroke-volume found by gas-analysis,  $V_s, \Delta_{br}$  the physically calculated stroke volume.

If we bring the before mentioned cases together with those in this table, we get an average absolute deviation on all the 80 cases examined of 11.1 % compared with the acetylene method. Such a deviation is perhaps not too great, and clinical acceptable results usually can be obtained by this method. Absolute deviations of more than 25 % are relatively few. All in all there are 7 cases of the above mentioned 80, among them 5 in positive and 2 in negative direction. Further it can be said, that in the previous note the cross section  $Q$  of aorta ascendens has been

Table 1.

Comparison between the cardiac output  $V_s$  found by gas analysis and the volume  $V_{s, \Delta_{br}}$  calculated according to formula (1).

Sign.	Age	Sex	Height	Blood pressure in mm Hg. Brach. art.	c in cm sec.-1	T in °	$V_s$ in cm <sup>3</sup>	$V_{s, \Delta_{br}}$ in cm <sup>3</sup>
S-d	16	F.	168	145/95	575	725	58	44
P-e	17	F.	162	111/77	500	570	46	46
A-n	19	F.	163	110/80	500	600	27	30
K-n	19	M.	166	110/70	530	1020	68	64
P-n	19	F.	162	106/76	500	1010	56	46
K-n	20	F.	166	102/70	630	910	37	31
V-d	20	M.	170	115/75	550	1010	53	54
A-n	22	F.	159	109/75	610	930	35	35
W-n	23	F.	162	98/72	490	945	47	46
A-n	24	F.	162	150/95	700	740	37	38
H-g	24	F.	164	106/73	530	790	45	38
J-n	24	F.	162	100/78	480	1000	42	41
B-t	25	F.	161	111/82	540	1220	57	51
J-n	25	F.	162	100/75	500	1020	43	42
J-n	27	F.	163	118/80	520	730	41	44
N-n	27	F.	155	125/87	510	870	56	50
P-y	27	F.	163	108/65	620	930	55	47
S-r	30	F.	160	103/75	590	800	37	32
P-n	32	F.	168	130/75	690	680	34	40
R-n	32	M.	178	122/78	700	660	36	33
K-m	34	F.	158	102/68	500	800	35	46
L-g	35	F.	164	150/80	700	640	46	46
E-n	37	M.	160	115/73	605	1000	57	51
R-d	37	F.	165	157/97	790	720	38	35
S-g	38	M.	175	145/95	740	880	55	51
E-g	40	M.	173	110/70	650	850	52	48
J-n	40	M.	177	130/85	660	760	56	49
R-g	40	M.	180	130/95	550	870	62	66
W-h	41	F.	156	145/105	680	870	55	39
M-n	42	M.	176	118/75	700	970	60	55
H-g	43	M.	176	115/85	650	1000	46	45
N-n	43	M.	187	126/90	600	930	54	62

Sign.	Age	Sex	Height	Blood pressure in mm Hg. Brach. art.	c in cm sec. <sup>-1</sup>	T in sec	V <sub>s</sub> in cm <sup>3</sup>	V <sub>s</sub> Δ <sub>br</sub> in cm <sup>3</sup>
Å-n	44	M.	176	115/85	680	960	48	47
E-n	45	M.	168	130/80	680	1020	68	67
K-n	46	M.	180	122/70	850	780	42	34
U-g	46	F.	161	118/72	720	760	37	38
F-m	47	M.	179	118/80	660	800	43	47
W-r	47	M.	172	152/103	690	780	51	49
K-m	49	F.	156	153/88	930	730	28	27
M-a	49	F.	171	165/110	920	850	44	40
J-n	50	M.	169	178/83	1000	1030	72	66
B-n	51	M.	179	120/90	650	900	49	46
P-n	53	M.	165	102/74	680	990	46	52
M-z	54	F.	158	160/84	900	900	50	55
F-l	56	F.	166	250/155	950	700	35	44
A-g	57	F.	162	182/111	900	800	48	48
M-n	57	F.	164	157/105	870	800	32	40
S-f	57	M.	165	175/104	950	750	41	43
A-n	59	F.	159	98/67	660	880	33	37
M-g	59	F.	164	126/80	760	900	37	48
H-n	60	M.	172	120/88	800	930	49	39
P-r	60	M.	175	185/107	980	1000	65	61
N-l	62	F.	156	158/95	870	940	43	52
S-n	66	M.	164	128/92	710	750	39	41
Å-d	70	M.	165	130/70	1000	940	39	44
A-n	75	M.	178	153/75	1030	1000	52	64

taken more summarily — only with regard to age — according to WETZLER's summing up of SUTER's tables. In the table above SUTER's more detailed original data have been employed, where age, sex and size have been taken into consideration. The average absolute deviation amounts now to about 10 %, while in the above mentioned note it amounts to 13 %. For  $T_n$  0.97 sec. have been used with men and 0.85 sec. with women. The difference depends to a large extent on the corresponding data about  $Q$  in SUTER's tables. A further improvement on the results can be obtained if  $T_n$  in addition is classified according to age.

### Frank's Fundamental Formula.

The widely known foundations of FRANK's air-chamber theory can be expressed in the following manner:

1) The storage  $\Delta V_a$  in the air-chamber during the interval  $\Delta t$  is equal to the difference between the volume of the stroke-flow arriving in the air-chamber  $\Delta V$  and the volume, which at the same time flows off from the air-chamber  $\Delta V_w$ .

2) The storage intensity  $i_a = i_a(t)$ , obtained after dividing with  $\Delta t$  and passing to the limit  $\Delta t \rightarrow 0$ , is the difference between the central stroke flow intensity  $i(t)$  and the flow intensity through the lead  $i_w(t)$ .

3) The intensity of the flow through the lead  $i_w(t)$  is determined according to POISEUILLE's law

$$(3) \quad i_w(t) = \frac{P(t)}{w}.$$

$P(t)$  is the pressure at the beginning of the lead and  $w$  the peripheral resistance (of the entire lead) considered as invariable.

4) The following relation exists between  $i_a(t)$  and the pressure  $P(t)$  of the air-chamber:

$$(4) \quad i_a(t) = \frac{P'(t)}{E}.$$

$P'$  is the derivative of the pressure with respect to the time  $t$  and  $E$  the volume elasticity modulus of the air-chamber, likewise regarded as invariable.

The fundamental differential equation of FRANK's air-chamber theory can, according to above be written as follows:

$$(5) \quad \frac{P'(t)}{E} + \frac{P(t)}{w} = i(t),$$

thus where  $i(t)$  in quite a clear manner indicates the *central* stroke-flow intensity (APÉRIA 1940, p. 220 and p. 226 formula 200). In many problems concerning the diastole, this intensity can be put with sufficient accuracy  $= 0$ .

In the extensive literature on FRANK's air-chamber theory we have not met, before quite recently (DEPPE 1941), the conception, that anyone should mean about  $i(t)$  in equation (5) that this signifies anything else than the mentioned central intensity of the stroke-flow. The possibility seemed to be especially excluded, that someone with the expression  $i(t)$  on the right side of equation (5) could understand the intensity of the flow  $i_w(t)$  through the lead. But this misunderstanding actually appears in the recent paper written by DEPPE (ibid. p. 450). On this basis DEPPE then criticizes the author for setting  $i(t)$ , as an approximation,  $= 0$  during diastole, just as all earlier writers have done, beginning with FRANK. The intensity of the flow through the lead  $i_w(t)$  is therewith certainly quite different from 0 at the chosen end point of the air-chamber. But it must not be con-



HALES assumed (1733), that all elastic vessels on the arterial side take part in the storage function. Under certain conditions even the whole arterial system could for that reason be regarded as an air-chamber. Several authors have, during the last few years brought forward the question, whether FRANK's theory should not really be applied to the whole arterial system in the organism, (cp. RECKLINGHAUSEN, WETZLER, WETTERER, DEPPE). The following reasons speak, however, against such an assumption (APÉRIA 1940, p. 221). There can, in this case be no question of a uniform pressure,  $P(t)$ , which prevails throughout the entire air-chamber at the same time. The very important relation  $E = \frac{\%}{V}$  in FRANK's theory is only valid with *cylindrical* tubes, where  $V$  signifies the volume of the air-chamber and  $\%$  the relative cross-section modulus, supposed to be constant. In hemodynamics equal areas for the total cross-section at physiologically equivalent places of the elastic system are usually required, instead of the real cylindrical form. The opinions of physiologists agree however that the total cross-section of the arterial system becomes wider towards the periphery (HESS, 1927).

Certainly there exists some doubt about the strict definition of the mentioned equivalence. According to YOUNG (1809) we require for instance equal actual cross sections at corresponding points. There is no question about the fact that the corresponding physical modulus is not even approximately equal at different places in the system.

We are therefore obliged in connection with the limitation of the air-chamber not to go too far towards the periphery, if we want to employ FRANK's theory. The practically convenient choice of the femoral artery as the distal end of the air-chamber is then still relatively well admitted, as far as this has reference to the exactitude of the fundamental formula (5).

In the following investigation we shall generally take into consideration RECKLINGHAUSEN's constant  $a$ , though this constant does not act considerably upon the validity of formula (2). The linear relation (6) is then applicable also to the femoral, if the retrograde wave there does not show any strong variations and has thus almost constant intensity.

Certain restrictions must also be taken into consideration about the validity of the relation (4). Since a uniform pressure at the

same time does not exist throughout the entire air-chamber chosen, an average value in the space for  $P'$  at the whole length of the air-chamber must in the mentioned formula then be taken. This fact has already been pointed out by WETTERER (1941). Such accuracy, however, is of little use in practice. The author has, for that reason previously suggested (1940, p. 220 and 226), that  $P'$  of a *mean* cross-section approximately should, for the sake of simplicity, be considered as decisive for the storage. Instead of this however in FRANK's theory,  $P'$  is taken at the beginning of the lead. It will be shown in a subsequent section, that this contradiction on the application of FRANK's fundamental equation in hemodynamics does not involve such important consequence as one might believe.

In spite of the fact that a direct explanation has been given in an earlier paper by the author (1940, pp. 214 and 220), about the allowance for a relatively arbitrary limitation of FRANK's air-chamber, DEPPE reproaches the author for having undertaken such a limitation at femoral "ohne jede Begründung" (p. 449). This reproach is still later strengthened in the following manner (p. 466): "Will man sich also nicht über bekannteste physiologische Gegebenheiten hinwegsetzen und z. B. den Anfang des Gesamtwiderstandes einfach in die Femoralis verlegen . . . ." The latter can be interpreted in two different ways which mutually exclude one another and both are incorrect.

Either the linear formula (3) or formula (6) can on the whole be employed, as many authors suggest, first at the beginning of the capillaries because only there the POISEUILLE's lead in question can be considered as really existing. In this case a great part of FRANK's theory should no longer be applicable. Moreover we can hardly obtain pressure curves there. Most authors in hemodynamics have for that reason taken, even without satisfactory arguments, the beginning of POISEUILLE's lead more or less in the vicinity of the centre. WETZLER and BÖGER e. g. locate in many cases the end point of the air-chamber to the iliac artery. WETTERER states that the pressure in question in formula (3) is even that of the centre itself. The authorization for such limitations is not to be found, as has been emphasized above, on the foundation of POISEUILLE's flow constant in space, but on another basis, viz the undulatory. The writers in this range of science do thus *not*, at all events, pay regard to the mentioned "bekannteste physiologische Gegebenheiten", in consequence of practical and theoretical constraint.

Or DEPPE assumes perhaps, that only the theory of one in particular manner variable air-chamber, which recently has been developed by WETTERER (1941), actually corresponds to the physical necessity. An air-chamber, fixedly limited in the space is, however, as shown, physically admitted with an adequately exact development of the



theory. It is not excluded, that a correct foundation of the investigation of a variable air-chamber can in the future give certain improvements on some hemodynamical questions. It will be demonstrated below that there exists up to the present time in this direction only very imperfect attempts which physiologically as well as physically still lead to many doubts.

### Wetterer's Theory.

A correct theory for the varying air-chamber of the length  $l = l(t)$  should have the following appearance:

1. During a time-interval  $\Delta t$  the volume increase  $\Delta V_n$  for the air-chamber is equal to the difference between the central inflow  $\Delta V$  and the peripheral flow  $\Delta V_w$ .

2. On this basis the formulae (3, 4, 5) in FRANK's theory are valid with essentially the same limitations as have been indicated above. The main difference is, that the total expansibility

$$1/E = \frac{dV}{dP} = \frac{kV}{\rho c^2} + Q \frac{dl}{dP} \text{ now represents a function of time.}$$

WETTERER starts from the working-hypothesis, that the air-chamber during the whole systole increases strictly with the wave in the arterial tube. The velocity  $c$  of this wave is considered to be slightly variable and is experimentally given. The cross-section  $Q$  of the air-chamber is likewise regarded as slightly variable. The relation  $c/Q$  is therewith supposed to be constant. The relatively small variations of  $c$  may be neglected at the calculation of the length of the variable air-chamber, specially chosen by WETTERER. This length is consequently  $L = ct$  and we have for the variable air-chamber volume  $V = Q ct$ .

Also in this theory, the flow through the lead will take place according to formula (3). The pressure  $P(l, t)$  at the end point of the variable air-chamber is decisive for that flow. But with WETTERER's special presumptions that pressure is equal to the central systolic initial pressure  $P_0$  which propagates with the wave of the tube. The essentially peripheral POISEUILLE's resistance  $w$ , measured from the endpoint of the air-chamber, can be considered as practically constant. The intensity of the flow  $i_w$  from the air-chamber can, therefore, according to the mentioned theory be stated as

$$i_w(t) = \frac{P(l, t)}{w} = \frac{P_0}{w} = \text{constant.}$$

WETTERER uses instead

$$(8) \quad i_w(t) = \frac{P(t)}{w},$$

with central  $P(t)$ . Only a posteriori practical arguments are given for this assumption. WETTERER's attempt signifies, from the point of view of POISEUILLE's flow hitherto used in hemodynamics, that the beginning of POISEUILLE's lead is placed in his theory at the centre. There is not shown in what manner this hypothetical POISEUILLE's flow with central  $P$  is able to function simultaneously as the flow  $i_w$  at the end of the air-chamber, the latter being at the end of systole of the length  $cS$  ( $S$  = the time of systole). The corresponding part of FRANK's theory is, by this means, modified in a rather problematical manner.

WETTERER takes, as a second alternative, a hypothetical proportionality to the time for the systolic flow intensity  $i_w(t)$ , counting from the beginning of systole. The two alternatives are neither physiologically nor physically identical. The new alternative proposed approximates the real flow intensity curves only crudely.

Still more doubtful conclusions are drawn as to the storage. It may be assumed at first, that we have actually the right to make here use of the derivation  $P'(t)$  even with the central pressure for the storage. The latter takes place with an elasticity modulus  $E_1(t)$ , variable from moment to moment. It progresses, we can say, in thin layers with an intensity  $i_1$ , variable in time. The entire storage  $V_1$ , beginning with  $t = 0$  to an arbitrary time-point  $t$ , can thus be expressed with the formula:

$$(9) \quad V_1 = \int_0^t \frac{P'(t)}{E_1(t)} dt.$$

By the derivation of (9) we naturally obtain again:

$$i_1(t) = i_1 = \frac{P'(t)}{E_1(t)}.$$

Instead of the correct formula (9) WETTERER gives quite another one, in a wholly impermissible manner, as if the storage would take place with the *final* modulus  $E_1(t)$  during the whole time from 0 to  $t$ , corresponding to the end of  $t$  for the mentioned duration of time. Thus he puts it without paying attention to the actual physical course of the storage:

$$(10) \quad V_1 = \frac{1}{E_1(t)} \int_0^t P'(t) dt = \frac{P(t) - P_0}{E_1(t)}.$$

By the derivation of (10) moreover an incorrect formula appears also for  $i_1$  (l. c. formula 17). However, in the equation of continuity (l. c. formula 19) the member for the longitudinal volume increase-rate, arising in this theory, is to be left out.

After the correcting of the mentioned error we come to the following modification of FRANK's equation (5):

$$(11) \quad \frac{kQt}{\rho c} P'(t) + \frac{P(t)}{w} = i(t).$$

In reality there are more doubts concerning the employment of the central  $P'(t)$  than with the distal  $P'(t)$  corresponding to a fixedly chosen air-chamber of moderate dimensions. WETTERER's air-chamber attains, as mentioned, at the end of systole quite abnormal lengths. It is surely too inadequate to assume, that even at the moment indicated the alterations of the central pressure should be decisive for the storage in the entire air-chamber, the main part of which lies then so far peripherally.

BAZETT a. o. (1935) already raised the objection against BROEMSER's supposition as to an air-chamber of the length  $c S$ , that no place can be found in the organism for such lengths. WETTERER tries to meet this objection by referring to the circumstance that the variable air-chamber of the length  $ct$  continues "functionally" after having reached the periphery, viz. by reflections. The application of FRANK's theory (comp. p. 242) will then, however, be modified. The storage in the air-chamber proceeds now from both ends. The length  $l$  becomes  $l_0 = \text{const.}$  after the first peripheral reflection. The air-chamber remains non-cylindrical for the part of systole under consideration. The basis for the calculation of the storage is in this way highly affected. But WETTERER's equation (19) remains inapplicable.

The assumption of this writer about the relative constance of  $c/Q$  in the course of the variability of the air-chamber goes perhaps also too far.  $Q$  signifies the average total cross-section of the momentarily storing system,  $c$  the momentary mean pulse-wave velocity. We know, however, for instance, the facts as to the relatively great difference between the pulse-wave velocities of aorta ascendens and descendens in young individuals (BAZETT a. o. 1935) while the total cross-sections are here nearly equal. It is really not excluded, that the pulse wave velocity in several places at the periphery is lower than in the arteries of middle size (HAUCK 1938) while the total cross-section shows an opposite condition (HESS 1927.)

As a test for the practical value of any one air-chamber theory the corresponding stroke-volume formula may be investigated. Already BROEMSER and RANKE (1930) have used a length  $c S$  for their fixed air-chamber. A correcting factor  $z \propto 1/2$  must, however, therewith be employed in the corresponding stroke-volume formula. This can summarily be interpreted in such a manner, that the air-chamber really increases during the systole from 0 to the length  $c S$ . The average length would then amount to  $1/2 c S$ , which is decisive for the stroke-volume formula. Analogous numerical results can therefore, also be expected in WETTERER's theory. This will, on the whole, be verified in the 80 cases reproduced below. According to that schedule WETTERER's stroke-volume formula, at the deduction of which also DEPPE seems to have co-operated l. c. (1941, p. 466) gives generally even still less satisfactory results in comparison with gas analysis than the other known formulae from FRANK's school.

In the present state of the mentioned theory as described in the analysis above, we can only with a certain amount of caution take

notice of the following statement by DEPPE (1941, p. 438) in connection with some previously named papers. "Während die den systolischen Druckablauf des grossen Kreislaufes bedingenden hämodynamischen Vorgänge . . ., jetzt durch Untersuchungen von WETTERER und mir in einer mit der Wirklichkeit gut übereinstimmenden Weise geklärt werden konnten" a. s. o. As a matter of fact we are still far from having any deeper knowledge of the mentioned process.

### Comparison between Different Stroke-Volume Formulae.

FRANK's air-chamber theory signifies an extreme simplification of the actual physical conditions in the organism. We can therefore, only with same prudence, with regard to the supplementary hypothesis have hope of attaining a formula for the cardiac output which could be still clinically applicable. The previous attempts in this connection must be, in general, regarded as unfavourable. The theoretical cause for this is, that the different authors have not paid sufficient attention to the very doubtful physiological validity of the auxiliary hypotheses they used (l. c. APÉRIA, 1940). It can be said, that FRANK's theory in any case, that is to say with any one appropriately chosen supplementary hypothesis cannot give a quite satisfactory stroke-volume formula. The purpose of this paper is to show that relatively better results can here be obtained from FRANK's theory *without* such hypothesis. From a comparison between the previously given schedule and that reproduced below, it is obvious, that the author's stroke-volume formula leads generally to more favourable results with regard to the error limits than other known formulae in literature, in so far as they use only a single air-chamber. It is evident that a similar control can be carried out at every physiological laboratory where a sufficient number of hypertonical cases can be procured.

On the basis of the relatively extensive material gathered we can say that the previous formulae, recommended by different writers, are in general clinically unsatisfactory when especially cases of tachycardia, hypertonia and advanced age are concerned.

Regarding the formulae of BROEMSER and RANKE, of BROEMSER and later also of WETTERER and likewise partially of WETZLER and BÖGER the author has already earlier (1930) indicated the main cause, why these formulae may not be considered as quite adequately founded. Concerning WETZLER and BÖGER's

Table 2.

Comparison between different determinations of the cardiac output;  $V_{S,Br,R}$  calculated according to Broemser and Ranke,  $V_{S,Br,Wt}$  — to Broemser and Wetterer,  $V_{S,w,B}$  — to Wetzler — Böger.

Sign.	Sex.	Age	Syst endpr. ampli- tude in mm Hg.	$S$ in $\sigma$	$T$ in $\sigma$	$V_S$ in $\text{cm}^3$	$V_{S,Br,R}$	$V_{S,Br,Wt}$	$V_{S,w,B}$
S—d	F.	16	28	270	380	58	60	70	54
P—e	F.	17	21	300	480	46	51	63	54
A—n	F.	19	17	280	420	27	53	60	45
K—n	M.	19	23	310	440	68	66	76	66
P—n	F.	19	17	320	400	56	37	39	44
K—n	F.	20	17	320	410	37	42	44	35
P—n	M.	20	22	260	390	46	54	65	55
St—n	F.	20	23	290	390	66	60	68	54
V—d	M.	20	21	310	460	53	63	66	65
J—n	M.	21	22	300	450	58	82	80	86
A—n	F.	22	13	290	380	35	41	45	38
W—n	F.	23	14	310	410	47	50	54	40
A—n	F.	24	27	270	370	37	61	60	53
H—g	F.	24	16	290	460	45	52	50	53
J—n	F.	24	14	320	480	42	38	48	40
W—g	M.	24	34	240	360	54	90	87	91
B—t	F.	25	15	320	430	57	44	46	44
J—n	F.	25	16	310	440	43	38	49	38
J—n	F.	27	19	290	360	41	68	68	51
N—n	F.	27	24	270	320	56	51	64	47
P—y	F.	27	23	310	390	55	62	66	52
S—n	F.	28	20	290	370	28	45	51	58
H—g	M.	29	25	300	450	68	80	89	84
H—m	M.	29	20	310	410	57	100	89	87
S—e	M.	30	30	360	440	74	89	118	80
S—r	F.	30	18	280	370	37	40	51	34
S—w	M.	30	15	310	520	66	58	58	68
N—n	M.	31	28	270	310	36	83	103	51
J—m	M.	32	27	300	410	68	78	93	76
P—e	M.	32	22	270	380	58	92	94	69
P—n	F.	32	33	250	360	34	68	81	62

Sign.	Sex.	Age	Syst. endpr. ampli- tude in mm Hg.	$S$ in	$T$ in	$V_S$ in $\text{cm}^3$	$V_{S, Br, R}$	$V_{S, Br, Wt}$	$V_{S, W, B}$
P-n	M.	32	22	255	370	36	67	67	59
K-m	F.	34	18	300	400	35	68	71	55
L-g	F.	35	35	260	310	46	93	93	66
E-n	M.	37	27	300	390	57	66	92	60
R-d	F.	37	37	280	370	38	47	59	61
S-g	M.	38	26	290	380	55	79	82	68
E-g	M.	40	21	290	340	52	74	78	58
E-m	M.	40	28	300	360	55	89	96	73
J-n	M.	40	22	280	340	56	83	82	64
R-g	M.	40	20	310	340	62	87	100	62
R-n	M.	41	23	270	350	42	79	91	66
W-h	F.	41	25	300	390	55	62	77	50
F-d	M.	42	35	290	350	64	105	119	85
M-n	M.	42	30	300	480	60	70	73	78
H-g	M.	43	16	300	380	46	59	63	48
N-n	M.	43	21	300	400	54	80	94	73
Å-n	M.	44	22	280	380	48	62	77	60
E-n	M.	45	27	310	370	68	92	99	77
G-n	F.	45	65	300	300	59	128	166	87
L-n	M.	45	28	270	370	56	78	88	69
K-n	M.	46	25	280	380	42	72	76	64
U-g	F.	46	25	280	310	37	64	69	47
F-m	M.	47	21	300	420	43	87	96	75
W-r	M.	47	34	280	320	51	90	130	66
K-m	F.	49	36	270	360	28	68	75	58
K-n	F.	49	38	330	400	80	107	135	87
M-a	F.	49	37	285	370	44	72	98	54
J-n	M.	50	50	310	340	72	127	133	97
B-n	M.	51	16	300	390	49	64	68	54
N-n	M.	52	39	320	380	43	104	135	80
P-n	M.	53	15	300	330	46	55	61	42
W-n	M.	53	80	290	290	55	138	170	90
M-z	F.	54	57	310	320	50	104	116	71
F-l	F.	56	55	250	260	35	89	104	73
A-g	F.	57	55	310	320	48	150	218	89
M-n	F.	57	33	290	320	32	81	103	57

Sign.	Sex.	Age	Syst. endpr. ampli- tude in mm Hg	$S$ in $\sigma$	$T$ in $\sigma$	$V_S$ in $\text{cm}^3$	$V_{S, Br, R}$	$V_{S, Br, Wt}$	$V_{S, W, B}$
S—f	M.	57	40	260	350	41	87	98	76
A—n	F.	59	24	320	390	33	62	97	42
M—g	F.	59	27	310	380	37	83	98	66
H—n	M.	60	18	310	350	49	64	71	47
P—r	M.	60	47	310	320	65	120	145	85
N—l	F.	62	43	300	340	43	87	120	68
R—m	M.	66	44	300	320	55	82	107	79
S—n	M.	66	21	280	340	39	83	97	59
N—m	M.	67	50	300	320	52	115	136	80
H—m	M.	69	62	340	310	53	167	216	108
E—l	M.	70	45	290	320	49	108	140	80
Å—d	M.	70	41	310	340	39	99	136	73
A—n	M.	75	51	320	370	52	125	164	110

formula it can be added, that these authors use, even against their own prescription, the total blood-pressure amplitude  $\Delta P$  instead of the systolic end amplitude  $\Delta_S P$ , i. e. the difference between the end systolic and the diastolic pressure. This omission can be avoided. We then obtain considerably more favourable results for higher age-groups and with cases of hypertonia and tachycardia but less favourable figures for the other cases (errors sometimes show more than — 50 %). The practical applicability remains therefore problematical.

It can be of interest to mention, that WETZLER and BÖGER's formula becomes improved, if we use a supplementary factor in form of  $\frac{100 \text{ mm Hg}}{P_M}$ , where  $P_M$  indicates the arithmetical mean pressure and 100 mm Hg can be considered as a sort of "normal mean pressure". This gives the same effect as if we introduce the LILJESTRAND-ZANDER's reduced blood-pressure amplitude  $\frac{\Delta P}{P_M}$  together with a correcting constant factor, in the mentioned formula instead of the amplitude itself. The theoretical reason for this improvement is perhaps given by the fact, that the reduced amplitude contains implicitly the ratio  $\gamma$  between the elasticity modulus  $E$  and the resistance  $w$  (APÉRIA,

1941, p. 67). The absolute average error for WETZLER and BÖGER's formula can after the correction above be reduced from 37 to 28 %. But even that is certainly not enough for clinical use.

In the schedule above some formulae suggested by v. RECKLINGHAUSEN have not been included. This depends partly on the usage of a mean pulse wave velocity  $\bar{c}$  for the entire arterial system and partly on an adaption to BROEMSER's conception about the length of the air-chamber  $e$  S with the named formulae. In the first case a precise quantitative definition has not been given for the problematical  $\bar{c}$ . With regard to the other case, it appears in some controlled data of WETZLER and THAUER (1941) that the corresponding results in essential do not differ from those found by BROEMSER's formula.

The following may be noted concerning FRANK's and WETZLER and BÖGER's auxilliary hypothesis. These authors use FRANK's conception of a "fundamental oscillation" for the arterial system quantitatively in such a manner, as if this system really were an ordinary oscillator of the second order. There is, however, no proof given anywhere in literature that such an assumption is sufficiently justified. BROEMSER's attempts on the subject in question (1932, 1939) are not, as the author intends to show in another connection, conclusive enough for such a proof. A more careful FOURIER analysis of a sufficient number of cases will then show that the arterial system is not, even approximately, a simple oscillator of the second order. Theoretical reasons can also be given for this statement.

WETZLER applies, in addition, the hypothesis, that the cardiac output always is twice the storage volume at the end of systole. Even the approximate general applicability for this assumption is not sufficiently proved (BAZETT, 1939) and just on the basis of FRANK's theory great deviations are here often to be found (APÉRIA, 1940, p. 43 a. 44 cp. fig. 9 a. 10). According to some remarks by BAZETT (1939, l. e. p. 168) such deviations have also been shown experimentally.

Further, it may be noted, that WETZLER proceeds with the estimation of the length of the "half-upon" air-chamber as if the fundamental oscillation were a strictly undamped sinusoidal movement. In reality this is not so. The corresponding systematical error becomes in this way sometimes significant.

In the following discussion the arguments will be submitted, which the author has employed for his own stroke-volume formula (2).

### The Relative Diastolic Pressure-Fall Intensity.

Formula (2) for the stroke-volume is obtained by using a fixedly chosen arterial air-chamber. For  $\gamma = \frac{E}{W}$  we must here, because it is only approximately constant in time, try to find



a suitable value. This can scarcely at present be calculated in any other way than in a graphically analytical manner (1940, p. 24) by using the diastolic part of the given pressure curve. Through the at least approximately correct presumption for the diastole  $i(t) = 0$  we obtain  $\gamma$ , from FRANK's fundamental equation, at the nearest approach as a function of time:

$$(12) \quad \gamma = -\frac{P'(t)}{P(t)} = \gamma(t).$$

The thus defined function  $\gamma(t)$  valid for the duration of diastole, can therefore be constructed immediately by calculation from an empirically recorded pressure curve  $P(t)$ . The author has carried this out in several cases (1940, p. 26 a. 27) and therewith found great deviations from a constant value. Any direct experimental confirmation on this point could not be obtained for FRANK's theory. That the analysis of  $\gamma(t)$  has only been undertaken for the duration of diastole is evident from the deduction of this function, and has expressly been emphasized by the author (p. 24, 25, 27, 28, 31).

Surely then abstractly  $\gamma(t)$  could be defined on the basis of equation (12) also for the systole and thereby for the entire pulse period  $T$ . Such an extension is without importance either physically or physiologically. The author had no idea, that any critic could mistake his  $\gamma$ -diagrams, defined so explicitly for the diastole ( $i = 0$ ), as curves given for the entire pulse period. Besides numerous statements in the text itself (s. a.) the simplest mathematical consideration of these diagrams must at a glance show that such a misunderstanding should not occur. The given diagrams would namely at a systolic extrapolation of formula (12) at least with regard to the ascending part of the pressure curve always show strong negative constituent parts. The diastolic diagrams in question are, on the contrary, apart from possible slight deviations, decidedly positive. In spite of this evident fact, DEPPE expresses the opinion, that the author's  $\gamma$ -diagram should be adopted to the whole pulse period  $T$ . DEPPE misunderstands thus among other things, the particular  $\gamma$ -curve with the duration of the diastole  $D = 0.8$  sec., which he reproduces (l. c. p. 450). Beside this  $\gamma$ -curve DEPPE also reproduces the corresponding curve of the femoral pulse course, for which he suggests the pulse period  $T$  to be likewise  $= 0.8$  sec. According to the author's prescription (p. 26) it can immediately be seen that in the case under discussion we have  $T = 1.1$  sec. Consequently from the definition formula, that the represented  $\gamma$ -diagram, being throughout positive, cannot include the systolic part of the corresponding pressure curve. But the mistakes rejected above are those on which DEPPE based his critical reasoning concerning the author's  $\gamma$ .

At the same time it should not be assumed that the author has placed the beginning of the diastole "aller Warscheinlichkeit nach" (DEPPE, *ibd.*, p. 449) even before the time for the pressure maximum. Negative parts must then again appear in the  $\gamma(t)$  diagrams just at the beginning of that "diastole". Such deviations are never to be found in the author's figures. From the text in question we can, moreover see (p. 23) that in the hydraulic part of his paper, where a single curve is treated, the author fixes accordingly to the air-chamber theory the end point for diastole at the minimum pressure  $P_0$ . The duration of diastole is then to be read in the usual manner on the synchronously recorded central curve. The author thought that this would be quite evident to every physiologist and should therefore scarcely require an explanation. The time interval between the deepest point of the incisura and the pressure minimum before the ascending part of the central pressure curve, has been taken for the duration  $D$  of the diastole. This definition is, for practical reasons quite common in literature. The author has moreover in the *summary* of his paper (1940) expressly indicated, that at an exact application of FRANK's theory (l. c. p. 226): "for the calculation of the relative pressure-fall  $\gamma = E:w$  for the diastole, the central *diastolic* time must be used for the sake of correctness". The above mentioned inquire and hypothesis in this direction are therefore unnecessary.

There is, however, a different question whether, we should regard the determination of an appropriate constant  $\gamma$  as entirely without significance, as DEPPE (1941, p. 451) means. To give up even the approximate constant  $\gamma$  would be, in reality, to let all the quantitative consequences of FRANK's theory come to nothing. Especially formula (2) would then lose its value. Nevertheless, it has been shown, that clinically useful results can be obtained with this formula. Such an applicability being established in the results above (e. g. p. 240, tab. I) and better theoretical results being still undeveloped, the calculation of an appropriate  $\gamma$ , as proposed already by BROEMSER and RANKE (1930) is sufficiently justified. We can effect on this basis the mathematical reconstruction of several important functions for the circulation: the course of the flow, heart work curves and so on (1940). These functions, certainly, can claim only a limited validity. At least in this direction the  $\gamma$ -diagram obtained might have some clinical interest, so long as we have not access to more exact theories.

For the sake of completeness we reply also to two remaining objections also raised by the named writer: these refer partly to the technical and partly to the physiological sphere.

DEPPE doubts the authenticity of diagrams, delivered by ABRAMSON's torsion band oscillator as a pressure recording apparatus. In-

stead of this he recommends manometers of "hoher Güte". The choice of the torsion band oscillator has been made on the basis of the theoretical and experimental accounts by ABRAMSON himself (1939). According to these (and other still unpublished investigations on the same matter) the quality of the above mentioned apparatus corresponds to or even surpasses the best hitherto employed physiological manometers. The author's experimental results can, moreover, all be verified with other good manometers e. g. as also the statements for hypertonic cases. There exist important reasons, of a theoretical, as well as of an experimental nature for the assumption that the results in question on the whole will then be again verified. A little proof of this is, by the way, that the animal experimental part of DERFFE's paper in essentials has in view the establishment of the inconstancy of the diastolic  $\gamma$ , which the author previously has shown on human beings.

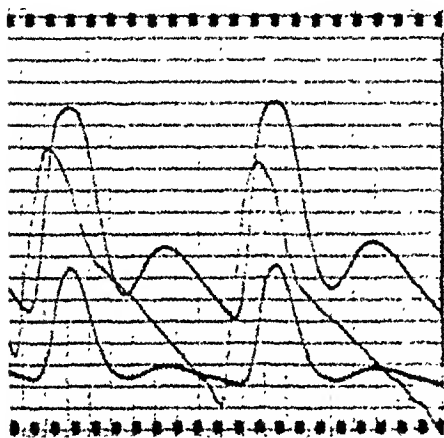


Fig. 1. Original pressure curves of the femoral, popliteal and the dorsalis pedis arteries from a 28 years old man. Time stated in  $\frac{1}{10}$  and  $\frac{1}{100}$  sec.

Slight, disturbing trembles from any part of the recording apparatus, for instance a connection tube, or if an old person is examined can exert an influence upon the pressure curve. Such occasional perturbations will be quite insignificant, the mentioned results having been obtained in a great number of cases and received also in an evident manner on curves, where no perturbations were found. These perturbations need not have their cause in the recording apparatus. This is obvious from the

existence of such curves as e. g. those reproduced above and obtained by means of ABRAMSON's torsion band simultaneously at the femoral, popliteal and dorsalis pedis arteries.

The most important of DERFFE's objections concerns the admissibility to measure the pressure course on human beings in a bloodless way. The course of the bloody and bloodless recording, if accurately carried out, are found to be very similar. This will be seen from numerous comparative measurements done by BONSDORFF (1932). FRANK has earlier pointed out (1929), that bloodless recording of blood pressure can be performed in a satisfactory manner.

## Explanation for the Stroke-Volume Formula (2).

The formula for the cardiac output

$$(2_1) \quad V_s = \frac{k \gamma Q L F}{\rho c^2},$$

is directly derived from FRANK's theory with improvement by an appropriate numerical factor  $k$  due viscosity and turbulence. This factor has been found (in another form) by MOENS experimentally and has been deduced theoretically by the author.

As long as we still want to apply FRANK's original theory, the calculation of an appropriate constant  $\gamma$  is necessary. With the definition commonly used in literature and applied also by the author in his paper (1940) for the end point of diastole in the air-chamber theory favourable results, however, could be attained with the formula. This also remains the case, when we replace the insufficiently founded expression (3), proportional to  $P$ , for the flow  $i_w$  by the linear local relation (6).

An improvement in comparison to the gasanalysis results was attained by means of choosing the beginning and end point of diastole for the peripheral curve synchronously with the corresponding *central* moments (comp. 1940, p. 226, 1941, p. 65). Theoretically, this is then referable to the approximation  $i(t) = 0$  for the central intensity, which might be considered allowable when no conditions of valve insufficiency are present.

But also at the application of formula (2<sub>1</sub>) could no satisfactory conformity be attained with the gas analytical control. There arises, however, a remarkable parallelism between the now theoretically calculated and the gas analytical values. The calculated values turn out, on the whole, directly proportional to the duration of the diastole. The corresponding correction factor can statistically be written as an average  $= D/0.4$  sec.

The time of diastole appears in this way as a correction factor. This can, on the basis of the air-chamber theory, conveniently be interpreted in the following manner. Conformably to the common conception in literature we accept the existence of one, in any appropriate way defined "efficient" air-chamber. The latter will not generally coincide with the air-chamber actually chosen in the case examined. The decisive volume  $Q L = V$  in the stroke volume formula (2) should, in conformity therewith be.

referred to the efficient air-chamber. The statistically stated correction factor above should then indicate, that the volume of the efficient air-chamber is, among other things proportional to the diastolic time. The blood volume stored, in the efficient air-chamber, should in this manner, under otherwise similar conditions, take a longer time to empty i. e. the greater the volume of efficient air-chamber, the longer the corresponding duration of diastole. The proportionality in question could also theoretically be considered as plausible as soon as a satisfactory foundation could be given for the "efficient" air-chamber. The latter limitation is necessary since the previous definitions in literature did not pay regard to the fact that the linear relation (6) may be used with weak reflectional variations for *every* point in the arterial system.

The "normal" diastolic time  $D_n$  amounts to about 0.6 sec. The statistical correction factor  $D/0.4$  sec., mentioned above can therefore also be written as  $\frac{3}{2} \times D/D_n$ . In this way then arises a correction factor  $\frac{3}{2}$ . How can this factor be explained theoretically?

It would be a mistake, if we thought, that the correction factor  $k \approx 0.6$  originating from the viscosity, were superfluous together with the new factor  $\frac{3}{2}$ . There exist sufficiently cogent, theoretical reasons for the necessity to take  $k$  (1940, p. 156) into consideration. An explanation for this new factor  $\frac{3}{2}$  must therefore be given.

Two facts, which have previously not been regarded, will now be mentioned. The ascending part of aorta up to the left subclavian artery constitutes an important part of the considered air-chamber. The pulse wave velocity  $c$  between the subclavian and femoral arteries, otherwise used in this theory, is *not* valid there. Especially in young human beings we find in aorta ascendens a considerably *lower* pulse wave velocity  $\approx 0.7 c$ . than in the mentioned main section (cp. BAZETT a. o. 1935). This can be compensated, by adding to the air-chamber a corresponding part of the femoral artery, which on an average has a *higher* velocity, 1.2  $c$ . For older persons it is better to take on an average 0.8  $c$  respectively 1.1  $c$  instead of the mentioned boundary velocities. The formation of the mean values for the velocities ought then to take place according to formula:

$$\frac{L}{c} = \frac{L_1}{c_1} + \frac{L_2}{c_2} + \frac{L_3}{c_3},$$

where  $L_i$  signifies the length of the separate consecutive sections,  $c_i$  the corresponding velocities.  $L = L_1 + L_2 + L_3$ . The searched

for additional length  $L_3$  is in both cases found to be 1.53 resp. 1.56 l.  $l = L_1 + L_2$  is the length between the root of aorta and the femoral artery. The length  $L_1$  of aorta between the root and subclavian can, on an average, be put down at  $\infty 0.2$  l. Through small adjustments of the pulse wave velocities we can obtain more rounded  $L \infty 1.5$  l. The above mentioned compensation can be considered as relatively crude. But this corresponds just to the low degree of approximation to the whole of FRANK's theory as compared to reality.

$L = \frac{3}{2} l$  appears also as the crude average between  $L = l$ , valid for formula (3, 6) and  $L = 2l$ , approximately to be adopted for the formula (4).

The discussion above concerning the velocity  $c$ , could be carried out on a greater number of age groups separately. A form for the correction factor for the ratio  $L/l$  should then be able to be used according to age.  $L$  would then design all the length of the efficient air-chamber for normal diastolic duration  $D = D_n$ ,  $l$  the actual chosen length for the recording.

It would be still better if we could examine every individual case regarding the pulse wave velocities in question. Such an investigation is, however, always somewhat laborious and for this reason the summary correction factor  $3/2$  has been maintained throughout in this paper.

In the discussion above three consecutive air-chambers have already been considered as joined to one. BAZETT (1935) has already indicated, that relatively good physical stroke volume results can be attained by means of introducing several air-chambers and using empirical coefficients for each of them. The real experimental employment of several air-chambers is however very circumstantial and the statistical estimate of the above mentioned coefficients, empirically performed by BAZETT is, from a physical point of view perhaps difficult to understand. The mean values formation used above for  $l/c$  appears on the contrary to be theoretically convenient. We can, moreover, work in this manner apparently with a single air-chamber, as it is preferable in practice. A mean value calculating in space for an appropriate function of  $c$  has also been proposed by v. RECKLINGHAUSEN (1940, p. 377) as a generalisation of BAZETT's formula. But it is practically impossible to apply this proportion, which requires a too special knowledge of all parts of the arterial system.

BROEMSER and RANKE and also other authors use — at least functionally — an air-chamber of the length  $cS$  under the implicit presumption, that the pulse wave velocity for the section subclavian-femoral

is also valid for the so great lengths as they considered. This is, however, surely not the case especially for young individuals. Nevertheless, we obtain with the corresponding formulae better results in the case of young human beings than for higher age groups. This depends on the circumstance that the air-chamber in question lies with low  $e$  within the limits of the organism.

By adding half the length of the original air-chamber to that of the latter the idea of the left side of FRANK's fundamental equation (5) suffers a certain modification, since in this equation  $P'$  and  $P$  are referred to the values, recorded at the femoral. The decided point for  $P'$  will now be at the distance  $l$  from the centre instead of  $\frac{3}{4}l$ . This is, however, better than in the previous case, where  $P'$  was taken up at  $l$  instead of  $\frac{1}{2}l$ . The recording of  $P$  at the femoral will, on the contrary, be less favourable, as the recording is now carried out at  $l$  instead of  $\frac{3}{2}l$ . It must not be forgotten however that equation (5) ought to be integrated for the entire pulse period, if we want to deduce a stroke volume formula. The integral for  $P'$  remains zero, that for  $P$  changes very slightly. The conclusive result in formula (2) does not therefore in all probability change considerably, if we neglect the displacement in question.

It is clear that the central flow  $i(t)$  on the right side of (5) is not at all affected by the distal displacement above.

Similar arguments could be taken into consideration with regard to the definite fixation of the efficient length of the air-chamber through multiplication with  $D/D_n$  in general. Only with anormal  $D$ , that is to say at tachycardia and bradycardia will the results theoretically be not wholly free from objections. The corresponding cases examined by the author indicate however scarcely any greater deviations between theory and gas analysis determinations than in normal cases.

The efficient length of the air-chamber  $L = \frac{3}{2} D/D_n l$ , introduced above, is due to the originally chosen length  $l$ , the moduli  $\kappa$  and  $E$  as well as to the pulse wave velocity  $c$ . Contrary to usual earlier conceptions in literature this new air-chamber is therefore no longer theoretically fixed so long as we leave  $l$  arbitrarily.

### Non-Basal Conditions.

Under non basal conditions there appear as a rule stronger reflection variations, which can make the linear relation (6) even approximately inapplicable. Besides this we have then also probably stronger changes in the local pulse wave velocities  $c$ , from section to section. There is little hope that even with the best possible use of FRANK's original theory, we can find a wholly general stroke volume formula also for non basal cases, the results of which would turn out sufficiently well in

comparison to gas analysis. At least, some new auxiliary hypothesis ought to be used for this purpose.

Several authors consider their own stroke volume formulae, obtained by means of such complementary hypotheses, as absolutely reliable for arbitrary conditions. The actual validity of the above mentioned hypotheses is, however, doubtful from a physiological point of view. Practical results seem occasionally to support the mentioned hypotheses. But there are also facts present, which contradict the formulae in question. These formulae give in reality, as has been shown above, no general correct cardiac output even for basal conditions.

In this paper we shall refrain from deducing a physical formula for the cardiac output, valid also for non basal conditions. In practice it appears best to calculate in every case the corresponding LILJESTRAND-ZANDER's ( $=L-Z$ ) constant  $C$  with the aid of the basal individual cardiac output, considered as known. We then have:

$C = V_s : \frac{\Delta P}{P_M} = \text{cardiac output per minute: reduced amplitude frequency product.}$

It has already been mentioned that just the reduced amplitude contains implicitly both the elasticity modulus  $E$  and the resistance  $w$ , a fact, which often has been disregarded (e. g. GROLLMAN—BAUMANN, WETZLER—THAUER).

The constant can be applied to the same individual under non basal conditions. Already earlier the author has pointed out (1940, p. 62) that the constancy of the ratio  $C$  in question, always considered for one and the same individual, must be regarded theoretically as problematic. Some plausible arguments can however be given, that the corresponding error limits need not necessarily be unacceptably great (1940, p. 63). The numerous experimental investigations in literature sufficiently justify the use of  $L-Z$  individual formula in practice, even where earlier known formulae are not applicable.

We find often in literature also negative opinions about the  $L-Z$  formula (GROLLMAN, NEUKIRCH). In order to reduce the error limits BLASIUS has recently (1940) suggested, instead of the individual constant  $C$ , to accept an individual linear relation between  $C$  and the mean pressure  $P_M$ .

Until quite recently there was probably none of the authors in this sphere of research (cp. the account of LILJESTRAND and ZANDER and GROLLMAN—BAUMANN), who has thought of considering the individual constant  $C$ , mentioned above, as quite general. LILJESTRAND and ZANDER expressly say about this (1928, p. 122). "Die Werte für die Relation zwischen Minutenvolumen und Produkt sind, wie zu erwarten



ist bei verschiedenen Versuchspersonen, verschieden", and the author (1940) has likewise pointed out the purely individual character of  $C$  (1940, p. 54). If anybody should, in spite of many explanations in literature, come to the erroneous interpretation of supposing  $C$  as species constant, valid e. g. for an experimental investigation on 9 dogs of different weight this investigation would as a rule show that this conception is incorrect. The experiments in question could then in perfect justice establish the fact, that the fictitious species constant  $C$ , here postulated were "nicht mehr ernst zu nehmen" and "aussichtslos".

WETZLER and THAUER (1941) use however indeed such a strange interpretation. They carried out 13 experiments on 9 dogs and arrived at the following results. (p. 276):

Gewicht, Kg.	9.0	10.0	11.0	15.2	17.0	21.4	25.0	25.2	30.2
$V_m$ , Fick	2.58	1.99	3.00	3.94	3.86	3.12	6.78	4.65	9.70
A.Fr.Pr.red.10 <sup>4</sup>	1.50		3.24	3.99	2.70				

The applicability of the always individual  $L-Z$  formula can here be controlled only in 4 cases. These cases show that  $L-Z$  formula sometimes agrees rather well, even under questionable physiological conditions. The worst results were obtained with the dog of lightest weight, but the two experimenters themselves regard their own measurements in this case as doubtful. The error limit of  $C$  in comparison with the corresponding mean value amounts to  $\pm 27\%$ . For the three other cases the analogous error limits are respectively  $\pm 4\%$ ,  $\pm 0.6\%$  and  $\pm 11\%$ . The separate individual  $C$  for the 9 animals examined naturally turned out quite different from one another. WETZLER and THAUER believe with this statement to have found counter-evidence against the  $L-Z$  formula. Strangely enough they attribute, without any reason, their own erroneous interpretation of the  $L-Z$  formula to the author, although the latter explicitly declared the reverse in the corresponding chapter of his paper (1940). The criticism given by WETZLER and THAUER on such foundations is accordingly meaningless.

WETZLER and THAUER's remarks, in connection with the other circumstance that the author has found a great inconstancy for the known BROEMSER's correction factor  $z$ , are also unfounded. They refer to ANTHONY and KOCH's investigations as proof of the reverse. ANTHONY and KOCH have used young students as experimental objects and found values between 0.35 and 0.69 for the "constant" BROEMSER's correction factor. On such normal material the author

has obtained similar results. WETZLER and BÖGER assume  $z = 0.48$ . It can, however, be mentioned about other statements in literature, that  $z$  varies e. g. between 0.21—0.26 in HARTL's investigations 1930. In HARTL and PETER's experiments on a mixed material (1941) values for  $z$  were obtained between 0.57 and 0.81, while BÖGER (1930) got values of  $z$  for rabbits between 0.16 and 0.57, for dogs 0.64—1.18. By this means, we obtain a verification of the inconstancy of  $z$  in addition to the corresponding confirmation by the author, founded on a mixed, (partly hypertonical) material.

The author has (1940), as mentioned, occasionally stated great deviations even under basal conditions, between the results of some physical stroke volume formulae, previously given in literature, and gas analysis. WETZLER and THAUER try to disclaim this statement attributing to the author a wrong usage of one or the other before mentioned methods (ibid., p. 248). The physical formulae in question are to such a degree elementary (for which they so often have been praised) that one must ask oneself in what manner an erroneous usage of them on the whole is possible. GROLLMAN's acetylene method on the other hand shows scarcely greater errors than  $\pm 10\%$  after several year careful use of this method by an experimenter.

The author has, on the whole, found the previous physical stroke volume formulae at normal pressure as perhaps still rather acceptable. WETZLER and THAUER on their side find now these formulae verified anew on 9 dogs with normal pressure. Nothing further has therewith been shown than that the corresponding auxiliary hypothesis, used in addition to FRANK's original theory under normal pressure, ought not to spoil the final results even under certain non basal conditions.

The author has in formula (2), scarcely applied supplementary hypotheses, expect perhaps 1) the statistically established fact, that on an average, under otherwise similar conditions, the length of the efficient air-chamber appears to be proportional to the duration of diastole, 2) the deduction for the normal correcting factor  $L:1 = 3:2$ , with  $D = D_n$ . The formula in question has, as mentioned, been tested on 80 cases under basal conditions. As the number of error sources and the corresponding error limits in FRANK's theory is great, 80 cases in this connection can be considered as a minimum rather than a convincing maximum. On account of the named experimental results which obviously contradicted the stroke-volume formulae of FRANK's school, the author proposed (1940) a revision in several directions of the

principles hitherto used in hemodynamics. A particular valuation of the error sources for FRANK's theory has, however, been accomplished only to a slight extent. After having obtained a physical stroke volume formula, which seems to be relatively well applicable to basal conditions in clinical practice, a general appreciation of the error sources in question might be expedient. It will then also appear that sometimes, though perhaps seldom, in applying the above mentioned formula deviations can be manifested against gas analysis, which are anew unacceptable for the physician.

### Error Analysis.

From the very beginning it will be noticed that the error valuation given in this paragraph may be considered as quite summarily meant and does not indicate more than the corresponding order of magnitude. The limits of the deciding sources of error have been valuated but crudely and taken on an average. These limits attain in arithmetical mean to about  $\pm 11$  %. For the sake of brevity a further examination will not be made for which error sources the given valuation can be considered as rather too high or rather too low.

Even if all magnitudes on the right side of formula (6) could be regarded as being correctly measured or calculated, the above mentioned formula is the less exact, the stronger the variations of the reflections are at the place in question. A sufficiently strict reflection theory has hitherto been lacking in hemodynamics. The first attempts at such a theory are to be found in v. KRIES (1892) and these have been recently taken up again by v. RECKLINGHAUSEN in a nearly unchanged form (1940, p. 478). When using KRIES' method we find as error limit for formula (6) on an average about  $\pm 10$  %, sometimes, however, considerably more.

The analogous absolute error limit for formula (4) is certainly in itself greater. It must, however, not be forgotten that formula (5) is, as mentioned, to be integrated for the entire pulse period in order to calculate the cardiac output. But the original integral for formula (4) is 0 for stationary conditions.  $P'$  is taken on an average at  $l = \frac{2}{3} L$  instead of at  $\frac{1}{2} L$  which is about 30 % erroneous. The absolute error limit for the calculation of the cardiac output might in consequence of the mentioned integration likewise not be equal to 0, but it amounts scarcely to more than 10 %.

The pressure  $P$  is assumed to be reproduced in a linear manner on the recorded pressure curve. The limit of the absolute error might perhaps amount here to 5 % on being recorded with a good apparatus.

For the estimation of the real pressure level  $P$  KOROTKOW's method is used in the above investigations. Opinions still differ with regard to the exactitude of the indirect blood pressure measurements. Cp. FRANK and WETZLER (1931), MALBY and WIGGERS (1932), v. BONSDORFF (1932), BAZETT and LAPLACE (1934) and v. RECKLINGHAUSEN (1940). The absolute error limit, with the mentioned method, might be put down roughly at about 15 %, though higher valuation sometimes are to be found in the literature.

The extensibility  $E^{-1}$  does not directly appear in formula (2), but is split up into several factors, which will further be considered below. The conductive power  $w^{-1}$  is to be found in formula (6) and is represented by  $\gamma E^{-1}$ .

For the graphically analytical calculation of  $\gamma$  (APÉRIA 1941) the pressure values are used at the beginning and the end of diastole under the assumption of weak variations of the reflections. Only the ratio of these pressures, however, is employed in the formula for  $\gamma$ . In consequence of this fact the limit for the absolute error can perhaps be put down at 5 %.

The lower pressure level  $a$  in formula (6) is quantitatively estimated in very different ways in the literature. v. RECKLINGHAUSEN (1906) indicates as an alternative the mean value at the capillaries, with a  $\sim 20$  mm Hg, respectively with that at the arterioli, with a  $\sim 40$  mm Hg. WHITTAKER and WINTON (1933) have found a  $\sim 20$  mm Hg under flow experiments with isolated limbs in dogs. Also BAZETT a. o. use this value (1935) in connection with the estimation of their cardiac output. These authors point out expressly and correctly the necessity of taking into consideration an appropriate  $a \neq 0$  in the air-chamber theory. GOMEZ (1937) obtains from the diastolic part of pressure curves a  $\sim 50$  mm Hg, even though the graphical means used are somewhat primitive. The author's more exact graphically analytical methods led also to similar values. The interpretation of  $a$  as a "statical virtual" pressure, obtained after the pinching of some suitable arteries seems, however, rather doubtful. The undulatory origin of  $a$  is actually quite different (1940, p. 196).

In the author's stroke volume formula only the blood pressure amplitude  $\Delta P$  is finally employed. It is evident that this  $\Delta P$  is not at all dependent on the magnitude of the peripheral pressure level  $a$  in the considered theory. But the influence of an individual  $a$  can effect some places in the theory, for instance with regard to the series development for  $\gamma$  (APÉRIA, 1941). We consider  $a$ , in each case only in the combination  $P-a$ . The pressure  $P$  is on an average 100 mm Hg.  $P-a$  varies accordingly, on an average, between 50 and 80 mm Hg, with an absolute error of 23 % (against 65 mm Hg). We suppose in consequence of the fact that only  $\Delta P$  appears in formula (1), that the influence of this error on  $V_s$  amounts then to about 10 %.

The common method for the calculation of  $c$ , expressly presumes only weak reflection variations. According to the considerations for the flow  $i_w$  we value the limit of the absolute error also for  $c$  to be about 10 % and thus for  $c^2$  about 20 %.

Data are to be found in the literature concerning the relation between the radius of vessels and the thickness of the vessel wall under unstretched conditions (KANI 1910, FRANK 1925) and concerning the correlation between the aortic cross-sectional area in a stretched and an unstretched condition (KANI 1910, VAQUEZ and BORDET 1920, 1928, KREUZFUCHS 1936). From SUTER's data, mentioned previously and obtained on the basis of measurements, taken of the ascending aorta post mortem, we can calculate the internal cross-sectional area. This calculation turns out somewhat higher than with the external cross-section in unstretched condition and will partly be compensated by the coronar circulation. The differences between the cross-sections at the proximal and distal ends of the air-chamber should also be taken into account. The eventual error with regard to the aortic cross-section area  $Q$  can be estimated at  $\pm 15$  %.

In formula (2) there still remains the valuation of  $k \times \frac{L}{l} \times \frac{1 \text{ sec.}}{D_n}$ .

The constants in question can only be statistically adjusted. Additional correction factors come from the non-cylindricity of the arterial system, the suspensory character of the blood (MÜLLER 1941), further at the application of the brachial  $\Delta P$  instead of the femoral (1941). Somewhat summarily the effect of these compensations may be estimated according to the average absolute error of the data given in table 1. The limit for the absolute error of the mentioned product might, for this reason be put at 10 %.

The cardiac output, calculated by the physical method, is each time controlled by GROLLMAN's acetylene method. But even the latter can give an absolute error of 10 %.

Above we have in all 10 fundamental error sources. The average limit for the absolute error is thereby 11 %. We do not, in the nature of things, make the highest error with each actual experiment. The actual error amounts approximately on the whole to only about the half, namely 5.5 %. This gives for each error source an alternative average error of either  $+ 5.5$  % or  $- 5.5$  %. Both signs are thereby possible. These alternative errors are distributed between all possible combinations for the 10 error sources. Summarily we can, therefore, put forward the following reflection of probabilities.

Out of  $2^{10} = 1024$  there occur 2 with only positive or only negative average errors. This should thus result in a total error of  $\pm 55$  %. After that it appears twice  $\binom{10}{1} = 20$  cases of 9 positive and 1 negative average error, total error of  $\pm 44$  %. Further, there are to be found twice  $\binom{10}{2} = 90$  cases with 8 positive and 2 negative average errors,

or the reverse and so on. In this manner we get consequently, roughly speaking, among 80 cases 19 cases with an absolute average error in the vicinity of 0 %, 34 in the vicinity of 11 %, 19 cases at 22 %, 7 cases at 33 % and 1 case at 44 %. If the average value limits are effaced, the following distribution can, on an average, be considered as probable for the 80 cases examined: 19 cases with an absolute error from 0 to 5.5 %, 34 cases between 5.5 and 16.5 %, 19 cases between 16.5 and 27.5 %, 7 cases between 27.5 and 38.5 %, 1 case with more than 38.5 %. The present grouping of the material here considered is respectively 23, 36, 15, 6 and 0. The attained conformity can be regarded as rather satisfactory for such a relatively primitive calculation of probabilities.

This conformity turns out still better, if we do not take 11 % as above but 10 % as an average limit for the 10 considered main error sources. Instead of above mentioned grouping we have then 21, 33, 17, 8 and 1 cases respectively.

In any case, however, total errors of 100 % and more are not entirely excluded. But they may appear so seldom that a clinical application of the stroke volume formula (1) does not seem inadvisable. It is surely then desirable in particularly dubious clinical cases to test the given physical method by gas analysis. From this we can see anew, that a further refinement of the theory can from a clinical point of view be considered as important.

### Summary.

The author has recently given a new formula for the physical calculation of the cardiac output with basal conditions involving but weak reflection variations. It seems, that the theory for the single air-chamber has been applied in this paper more strictly, than this usually occurs in the literature. The given formula has been tested on 80 cases by gas analysis and has therewith been proved in essentials to be more or less satisfactory. The average absolute deviation in comparison to gas analysis was not considerable (slightly over 10 %). Great deviations are more seldom than that is the case with corresponding formulae of earlier authors, but they appear however now and then. It has been shown that the previous formulae are to a certain extent theoretically insufficiently founded. It seemed in any case useful to examine the reasons why the air-chamber theory even with as exact a treatment as possible is unable to attain an exactitude, which will be always sufficient for the

practitioner. All physical magnitudes employed in this range of science have, therefore, been discussed with regard to either the exactitude of their theoretical foundation or to the accuracy of their measurements. A quantitative valuation of the possible corresponding absolute errors has, likewise, been carried out, in addition to the qualitative discussion. The values given on this occasion have not on the whole been closer developed, for brevity's sake, and serve but as a general orientation. Only a probability consideration could satisfactorily be given on the material with regard to the grouping of the relative errors of different magnitude.

Several attempts concerning the physical calculation of the cardiac output, otherwise given in literature, have been considered for comparison. The author has therewith seized the opportunity to reject an in essentials unfounded criticism, directed against his paper of 1940 from some authors of the Munich school.

The necessity of development of the usual air-chamber theory in the direction of exact hemodynamics has anew been demonstrated in a relatively vast material. The possibility of making occasionally too great errors with the physical calculation of the cardiac output exists, indeed, even with the most careful deductions from the theory of a single air-chamber.

### References.

- ABRAMSON, H.: Teknisk tidskrift 1939, *1*, 28.  
 ANTHONY, A. and A. KOCH: Dtsch. Arch. klin. Med. 1935, *177*, 158.  
 APÉRIA, A.: Skand. Arch. Physiol. 1940, *83*, Suppl. 16.  
 —, Acta Physiol. Scand. 1941, *2*, 64.  
 BAZETT, H. C.: Annual Rev. Physiol. 1939, *1*, 163.  
 —, and L. A. LAPLACE: Amer. J. Physiol. 1933, *103*, 321.  
 —, F. S. COTTON, L. A. LAPLACE and J. C. SCOTT: Amer. J. Physiol. 1935, *113*, 312.  
 BLASIUS, W.: Z. Kreisl. Forsch. 1941, *33*, 201.  
 BONSDORFF, v. B.: Zur Methodik des Blutdruckmessung, Akad. Abh. Helsingfors 1932.  
 BROEMSER, PH.: Z. Biol. 1932, *93*, 154.  
 —, Ibidem 1940, *100*, 88.  
 —, and F. RANKE: Ibidem 1930, *90*, 467.  
 BÖGER, A.: Ibidem 1930, *91*, 1.  
 DEPPE, B. and E. WETTERER, Ibidem 1940, *100*, 105.  
 —, Ibidem 1941, *101*, 437.

- FRANK, O.: *Ges. Morph. Physiol. Sitzungsber.* 1925/26, 37.  
 —, *Z. Biol.* 1899, 37, 483.  
 —, *Ibidem* 1929, 89, 263.  
 —, and K. WETZLER, *Ibidem* 1931, 01, 431.  
 GOMEZ, D.: *Les lois physiques de l'hémodynamique. Actualités scientifiques, Recherches d'Hémodynamique et Cardiologie*, nr 511, Paris 1937.  
 HALES, ST.: *Statik des Geblüts*, Halle 1748.  
 HARTL, K.: *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* 1930, 42, 245.  
 —, and H. PETER: *Klin. Wschr.* 1931, 10, 2030.  
 HAUCK.: *Z. Biol.* 1937, 98, 387.  
 HESS, W. R.: *Handb. norm. path. Physiol.*, Berlin 1927, VII/2, 918.  
 KANT, I.: *Virchows Arch.* 1910, 201, 45.  
 KEYS, A.: *Amer. J. Physiol.* 1941, 134, 268.  
 KREUZFUCHS, S.: *Münch. med. Wschr.* 1936, 1, 681.  
 KRIES v. J.: *Studien zur Pulslehre*, Freiburg 1892.  
 LILJESTRAND, G. and E. ZANDER: *Z. exp. Med.* 1928, 59, 105.  
 MOENS, A. J.: *Die Pulscurve*, Leiden 1878.  
 MÜLLER, A.: *Arch. Kreisl. Forsch.* 1941, 8, 245.  
 NEUKIRCH, F.: *Experim. Kredlöbsundersögelser*, Kjöbenhavn 1938.  
 RECKLINGHAUSEN V. H.: *Arch. exp. Path. Pharmak.* 1906, 56, 1.  
 —, *Blutdruckmessung und Kreislauf in der Arterien des Menschen*, Dresden und Leipzig 1940.  
 SUTER, F.: *Arch. exp. Path. Pharmak.* 1897, 39, 289.  
 VAQUEZ, H. and E. BORDET: *Radiologie de cœur et des vaisseaux de la base*, Paris 1920 and 1928.  
 WEBER, E. H.: *De pulsu, Anditu et Tactu*, Lipsiae 1834.  
 WETTERER, E.: *Z. Biol.* 1940, 100, 260.  
 WETZLER, K. and A. BÖGER: *Ergebn. Physiol.* 1939, 41, 292.  
 —, and R. THAUER: *Z. Exp. Med.* 1941, 109, 247.  
 WETZLER, K. and A. BÖGER: *Z. Kreisl. Forsch.* 1936, 28, 391, 553, 759.  
 —, *Arch. exp. Path. Pharmak.* 1936, 184, 253 and 482.  
 WHITTAKER, S. R. F. and F. R. WINTON: *J. Physiol.* 1933, 78, 339.  
 YOUNG, TH.: *Philos. Trans.* 1809, 24, 1.
-



## Untersuchung über die biologische Wirkung der Substanz P.

Von

BO GERNANDT.

(Eingegangen am 4. November 1941.)

---

Im Jahre 1931 beschrieben EULER und GADDUM einen Stoff, der bei Alkoholextraktion aus Darmwand von Kaninchen und Pferd gewonnen wurde und eine vorübergehende Blutdrucksenkung sowie eine bedeutende Steigerung der Darmmotorik bei Kaninchen verursachte. Auch bei Extraktion aus Gehirn, besonders der grauen Substanz, sowie Ventrikel und Blase erhielten sie diesen Stoff, der vorläufig die Bezeichnung »Substanz P« bekam (GADDUM und SCHILD, 1934).

Die aktive Substanz erwies sich als verschieden von Cholin oder Cholinestern, Histamin und anderen bekannten autopharmakologischen Stoffen. BACKMAN (1921) zeigte, dass Biodialysat, Dialysat und Alkoholextrakt aus Uterus am Kaninchendarm nach Atropinisierung Kontraktionen erzeugte, und JENDRASSIK (1929) beobachtete dieselbe Wirkung bei Extrakt aus Gehirn. Die Beziehungen der Substanz P zu diesen Stoffen sind nicht näher bekannt. (Siehe die ausführliche Darstellung in der Monographie von GADDUM, 1936). Cholecystokinin, beschrieben von IVY und OLDBERG (1928), ist ein Stoff, dessen Vorkommen, Eigenschaften und biologische Wirkung auf eine nahe Verwandtschaft mit Substanz P hindeutet. Das Cholecystokinin kommt im Darm vor und bewirkt ähnlich wie Substanz P Kontraktion der isolierten Gallenblase von Meerschweinchen (als Test auf Cholecystokinin benutzt) sowie stimuliert den isolierten Darm von Kaninchen. Die Wirkung besteht auch nach Atropinisierung. In Versuchen von BJURSTEDT, EULER und GERNANDT (1940) wurde gezeigt dass

Substanz P zwar in vielen Hinsichten sich wie Cholecystokinin verhielt, aber mit Bezug auf die Blutdruckwirkung am Kaninchen verschieden wirkte.

Bei der Darstellung der Substanz P aus Darm durch Extraktion mit Äthylalkohol-Wasser oder durch Kochen mit Wasser liess sich der aktive Prinzip mit Ammoniumsulfat ausfällen und konnte mit Trypsin inaktiviert werden. Diese und andere Beobachtungen deuten darauf hin, dass Substanz P von Eiweissnatur und wahrscheinlich ein Polypeptid ist (EULER, 1936). Sie erwies sich als löslich in Wasser und in 80—95 %-igem Alkohol, schwerlöslich in absolutem Alkohol und Aceton sowie unlöslich in Äther und Chloroform. Die wirksame Substanz ist durch Cellophanmembran ultrafiltrierbar und durch Kollodium dialysabel. Bei Elektrodialyse wanderte die aktive Substanz nach der Kathode, während sich die Anodenflüssigkeit als wirkungslos herausstellte. In Alkohol oder Wasserlösung blieb die Wirkung längere Zeit unverändert. Bei  $p_H$  4 vertrug die aktive Substanz stundenlanges Kochen, ohne an Aktivität zu verlieren. In alkalischer Lösung wurde Substanz P bei höheren Temperaturen leicht inaktiviert.

Substanz P wirkt auf glatte Muskulatur zahlreicher Organen stimulierend, wobei der Effekt besonders an der Darmmuskulatur ausgesprochen ist (EULER, 1936). In fortgesetzten Untersuchungen (BJURSTEDT, EULER und GERNANDT, 1940) zeigte sich, dass jeder Teil des Kaninchendarms auf die Substanz P mit gesteigertem Tonus und mit gesteigerter Amplitude der rhythmischen Spontankontraktionen reagierte. Dies wurde an einem isolierten Stück Darm in Tyrodelösung, der mit 5 %  $CO_2$  in Sauerstoff durchspült wurde, festgestellt.

In vorliegender Arbeit wurde die Wirkung der Substanz P auf Kaninchendarm in vivo teils durch intravenöse Zufuhr, teils durch direktes Auftragen auf die Darms Oberfläche untersucht. Ferner wurde die Wirkung auf Volumenveränderungen des isolierten Darmstückes nach der Methodik von TRENDELENBURG (1917) untersucht.

Das verwendete Präparat wurde aus Pferdedarm durch Extraktion mit Wasser bei 100° und Ausfällen mit Ammoniumsulfat erhalten. Es wurde weiterhin durch Ausfällung inerter Proteinstoffe mit Alkohol bei alkalischer Reaktion und durch Entfernung des Ammoniumsulfats gereinigt. Die reinsten Präparate enthielten 1 Einheit in 0.3 mg, wobei 1 E. 3—5 Schwellendosen an isoliertem Kaninchen jejunum in 30 ml Tyrodelösung entspricht.

## A. Die Wirkung auf die Darmbewegungen in vivo.

Als Versuchstiere wurden urethannarkotisierte Kaninchen (7 ml 20 % Lösung pro kg Körpergewicht) benutzt. Die Bauchwand wurde längs der Linea alba aufgeschnitten und eine 6—8 cm lange Schlinge des Jejunums etwa 20 cm vom Pylorus abgeschnürt, sowie eine weite Glaskanüle in dem coecalen Ende angebracht. Der Darminhalt wurde mit warmer Tyrodelösung herausgespült. Die abgeschnürte Darmschlinge wurde mit Tyrodelösung gefüllt und via Kanüle durch einen Schlauch mit einem Pistonrecorder verbunden. Der Darm wurde dann wieder in die Bauchhöhle zurückgelegt und mit einer feuchten Kompresse zudeckt. Die Registrierung wurde erst nach einer Stunde begonnen.

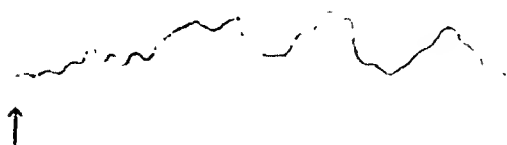


Abb. 1 a. Nach intravenöser Injektion von 5 E. »P« in 0.5 ml dest. Wasser Zunahme der Darmmotorik und der rhythmischen Volumenveränderungen.

Zeit: 10 Sekunden.



Abb. 1 b. Bei ↑ wird lokal längs Mesenterialrandes 5 E. »P« in 0.5 ml dest. Wasser appliziert.

Abb. 1. Kaninchen, Urethan, 6—8 cm langes Stück des Jejunums in situ gefüllt mit Tyrodelösung, oral abgebunden und coecal mit Pistonrecorder verbunden.

den Darm eines urethanbetäubten Kaninchens wurde auch photographisch registriert. Am Mesenterialrand einer Jejunumschlinge wurden 0.5 ml Lösung enthaltend 5 E. aufgeträufelt und nach 10—20 Sekunden traten kräftige Segmentationsbewegungen und peristaltische Wellen auf (Abb. 2). Die Wirkung hielt 5—10 Minuten an. Diese Wirkung der Substanz P konnte am Kaninchendarm in vivo nur am Duodenum, Jejunum und Ileum erzielt werden. Bei Versuchen am Colon mit der gleichen Menge wurde keine Wirkung beobachtet. Auch grösseren Menge, bis zu 30 E. erwiesen sich hier als unwirksam.

In die vena jugularis ext. wurde 5 E. Substanz P in 0.5 ml Lösung injiziert. Nach etwa 10 Sekunden trat gesteigerte Darmmotorik ein (Abb. 1 a). Wurde dieselbe Menge längs des Mesenterialrandes aufgetropft, so wurden gesteigerter Tonus und kräftigere Ausschläge der rhythmischen Spontan- kontraktionen ebenfalls erhalten (Abb. 1 b).

Die Einwirkung der Substanz P auf



Abb. 2 a.

Abb. 2 b.



Abb. 2 c.

Abb. 2. Kaninchen, Urethan, Jejunumschlinge in situ. In den Mesenterialrand wurden 5 E. »P« in 0.5 ml dest. Wasser geträufelt. Nach 10—20 Sekunden kräftige Segmentationsbewegungen und peristaltische Wellen. Die Wirkung hielt 5—10 Minuten an.

## B. Die Wirkung auf die Darmmotorik in vitro.

Alle Versuche wurden an einem isolierten Dünndarmstück aus dem Jejunum von Kaninchen ausgeführt. Bei den Versuchen wurde die von TRENDELENBURG (1917) beschriebene Methodik verwendet, welche eine gleichzeitige Registrierung der Längen- und Volumenveränderungen des Darmstückes zulässt. Das isolierte, 6—8 cm lange Dünndarmstück, das in ein Bad (100 ml) mit 40° Tyrodelösung, durchströmt mit 5 % CO<sub>2</sub> in Sauerstoff, gebracht wurde, wurde an dem einen Ende mit einer Fadenligatur zugebunden, die an einem Schreibarm zwecks Registrierung der Längenveränderung des Darmes befestigt wurde. Das andere offene Ende wurde über ein Glasröhrchen gebunden, das durch einen Schlauch mit einer zur Hälfte mit Tyrodelösung gefüllten Flasche in Verbindung stand. Der innere Darmdruck wurde als Differenz des Flüssigkeitsniveaus in der Flasche, die auf einem heb- und senkbaren Gestell angebracht war und der Flüssigkeitsoberfläche im Bade ge-

messen. Der Flaschenhals wurde mittelst Lufttransmission mit einem gut äquilibrierten Pistonrecorder verbunden, der also die Volumenveränderungen bei verschiedenem Druck registrierte.

Drei wenig verschiedene Drucken wurden ausgewählt, von denen der niedrigste keine, der nächste schwache und der höchste gute peristaltische Bewegungen auslöste, was wiederholte Male mit konstantem Resultat registriert wurde. Diese Wirkungen wurden z. B. bei Drucken von 9, 10 und 11 cm H<sub>2</sub>O erzielt. Wenn nun Substanz zum Badeflüssigkeit hinzugesetzt wurde konnte eine deutliche Erregbarkeitssteigerung beobachtet werden, so dass manchmal der vorher unterschwellige Druck wirksam wurde und die höheren Drucke eine bedeutend verstärkte Peristaltik auslöste. Diese Wirkung war z. B. auf 6 E. von Substanz P sehr ausgesprochen und trat auch mit niedrigeren Mengen klar zutage.

### Zusammenfassung.

1) Substanz P (EULER und GADDUM) stimuliert bei urethan-narkotisierten Kaninchen in vivo bei lokaler oder intravenöser Zufuhr die Dünndarmbewegungen. Am Colon wurde keine Wirkung erzielt.

2) Substanz P steigert die durch den endointestinalen Druck ausgelösten peristaltische Tätigkeit des Darmes.

Diese Arbeit wurde durch Mittel aus der Stiftung »Therese och Johan Anderssons Minne» unterstützt.

### Literaturverzeichnis.

- BJURSTEDT, H., U. S. v. EULER und B. GERNANDT: Skand. Arch. Physiol. 1940 83 257.  
 EULER, U. S. v. und J. H. GADDUM: J. Physiol. 1931 72 74.  
 EULER, U. S. v.: Skand. Arch. Physiol. 1936 73 142.  
 —, Arch. exp. path. Pharmac. 1936 181 181.  
 GADDUM, J. H. und H. SCHILD: J. Physiol. 1934—35 83 1.  
 TRENDLENBURG, P.: Arch. exp. path. Pharmac. 1917 81 55.
-

From the Pharmaceutical State Laboratory, Stockholm.

## On the Action of the Optical Isomers of Adrianol, Corbasil, Sympatol and Ephedrine on Isolated Intestine.

By

BÖRJE EMLSSON.

(Received 15 November 1941.)

---

The biological relations of optically isomeric substances have been reviewed by CUSHNY (1926). With regard to adrenaline and its substitutes the pharmacodynamical properties of the optical isomers have been the subject of a great deal of research. AHLGREN (1929) found 1-adrenaline more than 10 times as active as the d-isomer on isolated intestine; LINDNER and GÖPFERT (1938) report that the isomers of veritol have identical action. The literature dealing with the investigated drugs will be considered below.

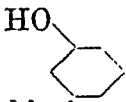
### Methods.

All the experiments were performed on isolated surviving rabbit's small intestine according to the Magnus technique. The rabbits were killed by a blow on the occiput followed by bleeding from the carotid artery. The intestinal segments were suspended in Tyrode solution at a temp. of 38° C. Through the solution, which consisted of NaCl 0.8 %, KCl 0.02 %, CaCl<sub>2</sub> 0.01 %, MgCl<sub>2</sub> 0.01 %, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.005 % and NaHCO<sub>3</sub> 0.01 %, was bubbled a mixture of 95 % O<sub>2</sub> and 5 % CO<sub>2</sub>.

The following drugs were used: 1-adrenaline-hydrochloride, 1-còr-basil-hydrochloride, d-còr-basil base, d-, l- and dl-ephedrine-hydrochloride from I. G. Farbenindustrie and 1-adrianol-hydrochloride, d-adrianol-tartrate, d- and l-sympatol-hydrochloride from C. H. Boeh-

ringer Solin.<sup>1</sup> The concentrations of the drugs are calculated as  $\gamma$ /m free base. In preparing the solutions of d-corbasil the calculated quantity of n/10 hydrochloric acid was added.

### Adrianol.

 CCNCC(O)C1CCCCC1O, methylaminomethyl(3-oxyphenyl) carbinol.

In Anglo-american literature generally called meta-synephrine or neosynephrine (the l-isomer), in German literature known as adrianol.

The pharmacological properties of adrianol were first investigated by KUSCHINSKY and OBERDISSE (1931). They found the inhibiting action of dl-adrianol on isolated intestine to be about 1/12 of that of adrenaline. BOYD (1937) found l-adrianol about  $\frac{1}{2}$  as active as l-adrenaline on isolated intestine, while AUMANN and YOUNG (1939) report the corresponding figure to be 1/4—1/10.

Some information on the action of l- and d-adrianol on isolated intestine may be gained from the tracings in the paper of DRAKE, JOHN, RENSHAW and THIENES (1939) on the responses of denervated smooth muscle to adrenaline substitutes. l-Adrianol seems to inhibit the intestine in conc. 0.5—1.0  $\gamma$ /ml, d-adrianol in conc. 2.0—10.0  $\gamma$ /ml.

TAINTER and STOCKTON (1939) compared the circulatory action of the optical isomers of adrianol and found the l-form about 40 times as active as the d-isomer. They were also able to establish a qualitative difference in the action of the isomers, as cocaine potentiated the action of l-adrianol but not of d-adrianol.

*Own investigations:* In conc. less than 0.2  $\gamma$ /ml l-adrianol does not affect the isolated intestine. Conc. 0.3—0.8  $\gamma$ /ml markedly decrease tone and amplitude and often cause temporary complete paralysis of pendulum movements. The effect is qualitatively quite similar to that of adrenaline; the activity of l-adrianol is about 1/10 of that of l-adrenaline.

d-Adrianol was found to be inactive in conc. less than 0.5  $\gamma$ /ml. Conc. 0.5—2.0  $\gamma$ /ml in most cases stimulated the intestine (increase of tone and amplitude); in some cases no effect could be demonstrated. However, this stimulant effect of d-adrianol is rather weak and inconstant. In conc. higher than 50  $\gamma$ /ml d-adrianol depresses the gut. 50—200  $\gamma$ /ml give a very weak and tran-

<sup>1</sup> I am most indebted to I. G. Farbenindustrie AG., Leverkusen am Rh. for a supply of the isomers of corbasil and ephedrine and to C. H. Boehringer Sohn, Ingelheim am Rh. for the isomers of adrianol and sympatol.

sitory effect; 300—700  $\gamma$ /ml give an inhibitory effect of moderate strength (slight fall of tone, decrease of amplitude to about  $\frac{1}{2}$ ). Thus the inhibiting activity of d-adrianol is about 1/10000 of l-adrianol and 1/100000 of l-adrenaline although the effects are qualitatively quite similar.

It will be noticed that d-adrianol stimulates the intestine in the same conc. at which l-adrianol has a very strong inhibiting effect. (See fig. 1.)

Obviously there is a considerable discrepancy between the findings of DRAKE, JOHN, RENSHAW and THIENES (*loc. cit.*) and mine as to the action of d-adrianol. A possible explanation of this difference is that the former investigators have used a preparation of d-adrianol containing some l-adrianol.



Fig. 1. Isolated rabbit's intestine in Tyrode solution.

- 1. = 0.8  $\gamma$ /ml d-adrianol.
- 2. = 0.8  $\gamma$ /ml l-adrianol.
- 3. = 70  $\gamma$ /ml d-adrianol.
- 4. = 220  $\gamma$ /ml d-adrianol.
- 5. = 360  $\gamma$ /ml d-adrianol.
- x = washing.
- 0. = washing 3 times.

MODERN and THIENES (1936) have investigated the antagonism towards adrenaline of a series of adrenaline substitutes. They found that neither l- nor d-adrianol exhibited any ability to antagonize the inhibiting action of adrenaline on isolated intestine. An accidental observation during an experience with d- and l-adrianol made me reinvestigate this problem. It was possible to demonstrate that d-adrianol in conc., which do not affect the intestinal motility in any way (20—40  $\gamma$ /ml), greatly diminishes or completely abolishes the inhibiting action of l-adrianol (0.5—0.8  $\gamma$ /ml) or l-adrenaline (0.05—0.08  $\gamma$ /ml) (See fig. 2.), whereas — curiously enough — the inhibiting action of l-corbasil (0.10—0.30  $\gamma$ /ml) is *not* decreased. After repeated washing with fresh Tyrode solution the effects of l-adrianol and l-adrenaline appear



again with full strength. In most cases, however, the primary inhibiting effect is followed by a secondary stimulation of the intestine. Generally this phenomenon is very often noticed following the influence of sympathicolytic drugs on the intestine and must be considered to have some connection with the supposed blockade of the sympathetic receptors.

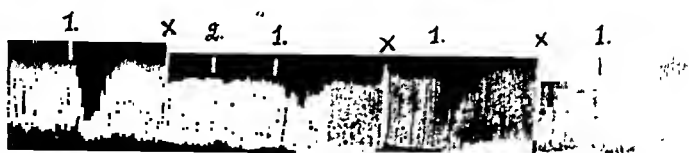


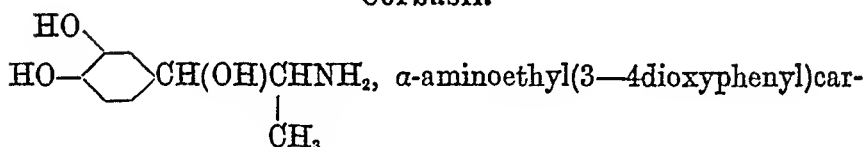
Fig. 2. Isolated rabbit's intestine in Tyrode solution.

1. = 0.8  $\gamma$ /ml 1-adrianol.

2. = 30  $\gamma$ /ml d-adrianol.

x = washing.

### Corbasil.



binol, 3—4dioxynorephedrine, cobefrine.

In his fundamental pharmacological investigation of oxy-ephedrines SCHAUAMANN (1931) found that corbasil inhibits the isolated intestine and that the inhibiting activity of dl-corbasil is about  $\frac{1}{2}$  of that of 1-adrenaline. CHEN and LING CHEN (1933) and HOYT, PATEK and THIENES (1934) confirm that corbasil inhibits the intestine without giving any detailed information on the effect. AUMANN and YOUMANS (loc. cit.) found dl-corbasil  $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{5}$  as active as 1-adrenaline.

SCHAUAMANN (1936) has investigated the action of the optical isomers of corbasil on blood pressure and uterus. According to him the l-form is 160—250 times as active as the d-isomer on blood pressure and 1 200 times as active on uterus. SCHAUAMANN also found the effects qualitatively dissimilar. The circulatory effect of l-corbasil is similar to that of adrenaline, while the effect of d-corbasil corresponds to that of ephedrine. Cocaine potentiates the action of l-corbasil but diminishes that of d-corbasil.

*Own investigations:* In conc. less than 0.01  $\gamma$ /ml l-corbasil has no influence on intestinal motility. Conc. 0.10—0.30  $\gamma$ /ml regularly inhibit the intestine (fall of tone, paralysis of pendulum movements). The effect is qualitatively quite similar to that of adrenaline; the activity of l-corbasil is  $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{3}$  of 1-adrenaline.

d-Corbasil is inactive in conc. less than 0.20  $\gamma$ /ml. In most cases it stimulates the intestine (moderate increase of amplitude or tone or both) in conc. 0.30—0.60  $\gamma$ /ml. However, this stimulant effect is rather weak and cannot always be reproduced. In conc. higher than 10  $\gamma$ /ml d-corbasil depresses the intestine. The inhibiting effect is qualitatively identical with that of l-corbasil, but the l-isomer is about 200 times as active.



Fig. 3. Isolated rabbit's intestine in Tyrode solution.

Just as is the case with the isomers of adrianol d-corbasil stimulates the intestine in the same conc., at which l-corbasil has a very strong inhibiting action.

- 1. = 0.20  $\gamma$ /ml l-corbasil.
- 2. = 40  $\gamma$ /ml d-corbasil.
- 3. = 0.36  $\gamma$ /ml d-corbasil.
- X = washing.

MODERN and THIENES (loc. cit.) report that dl-corbasil does not antagonize adrenaline on isolated intestine. In accordance with this it was found that d-corbasil — contrary to d-adrianol — in conc. up to 20  $\gamma$ /ml does not diminish the response to l-adrenaline, l-adrianol or l-corbasil.

### Sympatol.

OC1=CC=C(C=C1)C(O)CNCH3, methylaminomethyl(4-oxyphenyl)carbinol.

In Anglo-american literature known as synephrine or para-synephrine.

LASCH (1927) and EHRLSMANN and MALOFF (1928) report that sympatol inhibits the isolated rabbit's and rat's small intestine in conc. 100—500  $\gamma$ /ml. KUSCHINSKY (1930) finds the inhibiting activity of sympatol to be about 1/100 of adrenaline; he regards the effects of adrenaline and sympatol as qualitatively identical. AUMANN and YOUNG (loc. cit.) report that l-adrenaline is 500—1 000 times as active as dl-sympatol on isolated intestine. TAINTER and SEIDENFELD (1930) find the effects of sympatol on isolated rabbit's intestine very weak and inconstant. According to them l-sympatol inhibits the intestine in conc. 60—1 000  $\gamma$ /ml. d-Sympatol stimulates it in conc. about 200  $\gamma$ /ml (increase of tone but not of amplitude) but has an inhibiting effect in higher conc. The authors consider the inhibiting effect as due not to sympathetic stimulation but to direct muscular depression.

KUSCHINSKY (loc. cit.) finds 1-sympatol more than 50 times as active as the d-isomer on blood pressure.

*Own investigations:* On the whole I was able to confirm the findings of Tainter and Seidenfeld. 1-Sympatol is inactive in conc. less than 10  $\gamma$ /ml. In conc. 25—1200  $\gamma$ /ml 1-sympatol inhibits the intestine (decrease of tone or amplitude or both). The highest conc. often cause complete paralysis of pendulum movements. In these cases the effect may be rather difficult to wash out, 3—4 washings with fresh Tyrode solution being necessary for complete restoration of the motility of the intestine. It may be added that 1-sympatol was never seen to stimulate the intestine.



Fig. 4. Isolated rabbit's intestine in Tyrode solution.

1. = 220  $\gamma$ /ml 1-sympatol.
2. = 160  $\gamma$ /ml 1-sympatol.

Note the "motorial peak", which is unusually well developed.

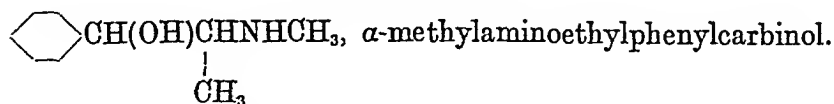
In some cases a weak and transitory increase of intestinal tone ("motorial peak") was seen immediately following the introduction of the drug. (See fig. 4.) This increase of tone is always accompanied by a decrease of amplitude.

In most cases d-sympatol stimulates the intestine in conc. 110—200  $\gamma$ /ml (increase of tone or amplitude or both) but this stimulant effect is rather weak and cannot

always be reproduced. In conc. 250—1200  $\gamma$ /ml d-sympatol inhibits the intestine. The effect is qualitatively identical with that of 1-sympatol; the activity is about  $\frac{1}{2}$  of the 1-isomer.

The inhibiting effect of 1- as well as of d-sympatol may be reproduced again and again, and the reactivity of the intestine does not seem to diminish in the course of the experiment. It may be emphasized that the inhibiting effect of sympatol is qualitatively quite different from that of adrenaline as it is never momentary but develops gradually and slowly; in many cases it is rather difficult to wash out.

### Ephedrine.



The very extensive literature on the action of ephedrine on isolated intestine is reviewed by CHEN and SCHMIDT (1930). Later KINOSHITA (1930—31) and NUKITA (1935) report that ephedrine always inhibits

the intestine. TERADA (1939) finds that low conc. are without effect or slightly depressant, whereas higher conc. have an inhibiting effect. Unfortunately these reports are too brief to evaluate. WEBER (1939) reports that ephedrine in most cases stimulates the isolated rabbit's intestine in conc. 0.04—0.4  $\gamma$ /ml. THIENES (1934) and PATEK and THIENES (1935) find that l-ephedrine occasionally augments the isolated rabbit's intestine in conc. 10—50  $\gamma$ /ml but in most cases inhibits it (conc. 10—200  $\gamma$ /ml.). dl-Ephedrine is in most cases inactive (2—160  $\gamma$ /ml), in one case inhibition was found in conc. 10  $\gamma$ /ml. The authors conclude that dl-ephedrine has much weaker muscle contracting properties than l-ephedrine. CHEN, WU and HENRIKSEN (1929) report only inhibition of the intestine (15—40  $\gamma$ /ml); they find l-, d- and dl-ephedrine equally potent.

Obviously the opinions as to the action of ephedrine on isolated intestine are very much divergent, some workers finding that ephedrine is only depressant, others reporting depression and stimulation, still others observing only stimulation. CHEN and SCHMIDT (loc. cit.) explain the discrepancies by assuming that the intestinal effects of ephedrine consist in a combined stimulation of ganglia (plexus of Auerbach), which causes increased motility, and of inhibitory sympathetic nerve endings. KINOSHITA (loc. cit.) concludes that ephedrine acts mainly on the sympathetic nerve endings, whereas the highest doses depress the muscle.

KREITMAR (1927) reported that l- and dl-ephedrine are equally active on blood pressure. Later workers have failed to confirm this. CURTIS (1928) and SCHAUMANN (1928) found the ratio between the activities of dl- and l-ephedrine to be about 1:2. PAK and READ (1928) give a ratio of 1:1.43, whereas CHEN (1928) finds 1:1.33, SCHAUMANN (loc. cit.) finds l-ephedrine 4—5 times as active as d-ephedrine on blood pressure and uterus, while CHEN and HENRIKSEN (loc. cit.) report the ratio 2.95:1 on blood pressure.

*Own investigations:* The optical isomers were found to have an identical action on isolated intestine. Therefore, in the following they are all comprised as ephedrine.

In most cases ephedrine was inactive in conc. 0.005—2.0  $\gamma$ /ml; occasionally a very weak motorial effect was observed at conc. 0.05—0.05  $\gamma$ /ml. Very often the intestine was augmented (slight increase of tone but only in a few cases of amplitude) in conc. about 2.5  $\gamma$ /ml. However, this effect always was very weak and often impossible to reproduce.

Occasionally ephedrine in conc. 4—8  $\gamma$ /ml has a very weak inhibiting effect. If the conc. is increased to 40—80  $\gamma$ /ml ephedrine *always* exerts a weak or moderate inhibiting action, which consists in decrease of tone or of amplitude but only in a few cases of both. The effect is never momentary but develops gradually

and slowly just as the effect of sympatol. It is rather easy to wash out and may be reproduced again and again. It will be especially noticed that contrary to a great many statements in the literature ephedrine was found *always* to depress the intestine in conc. higher than 40  $\gamma$ /ml.

In conc. 110—1100  $\gamma$ /ml ephedrine always has a very strong inhibiting action on the intestine, consisting in decrease of tone

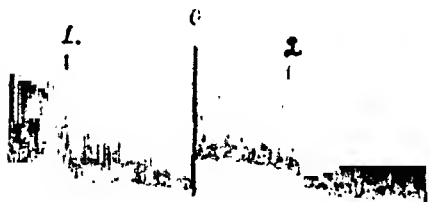


Fig. 5. Isolated rabbit's intestine in Tyrode solution.

- 1. = 560  $\gamma$ /ml l-ephedrine.
- 2. = 560  $\gamma$ /ml d-ephedrine.
- x = washing 3 times.

and considerable diminution of amplitude or in many cases complete paralysis of pendulum movements. The repeated reproduction of the effect is perfectly feasible. In many cases it is rather difficult to wash out, 3—4 washings being necessary. In rare cases it may be impossible to restore the motility of the intestine completely. The effect is qualitatively similar to

that of sympatol (see fig. 5) and shows the same peculiarities ("motorial peak") as this.

## Discussion.

A quantitative difference is found between the inhibiting activity on isolated intestine of the optical isomers of adrianol, corbasil and sympatol; as generally is the case the l-isomers possess the greatest pharmacodynamical activity. Contrary to this the isomers of ephedrine are equally active. The ratios between the activities of the isomers on isolated intestine are not the same as on blood pressure. Therefore, one is forced to conclude that the isomers of the four investigated drugs also show *qualitative* differences in their pharmacodynamical action, for only if that holds true, it may be expected that the order of potency for a mixed response, such as blood pressure changes, will not be consistent with a single effector response, such as changes in intestinal motility. This conclusion is supported by the finding that the d-isomers of adrianol, corbasil and sympatol in small doses stimulate the intestine, whereas stimulation was never observed upon the introduction of subactive doses of the l-isomers. As it is generally

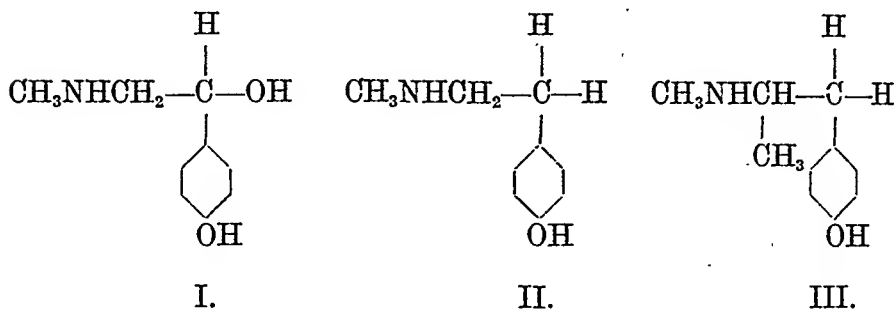
assumed that the intestinal effects of 1-corbasil and 1-adrianol are similar to or identical with that of 1-adrenaline, there is a certain discrepancy between my results and the observation of HOSKINS (1911—12), TASHIRO (1921) and MORIN (1940) that 1-adrenaline stimulates the intestine in minimal dose. Perhaps it may be possible by means of some special technique to demonstrate stimulation of the intestine by 1-adrianol or 1-corbasil. But even in that case the fact remains that the stimulating activity of the d-isomers is of a far greater order of magnitude than that of the l-isomers and therefore the qualitative differences in the mode of action are satisfactorily established.

Several hypotheses have been put forward to explain the different biological reactions of optical isomers (PASTEUR 1886, ERLENMEYER 1919, GOTTLIEB 1923, CUSHNY 1926). However, none of these theories is of any help in explaining qualitative differences in the action of enantiomorphic compounds. This difficulty may be overcome by the aid of the recent theory of EASSON and STEDMAN (1933). These authors conclude that there is no reason for differentiating between molecular dissymmetry and structure in regard to the manner in which they influence physiological activity and on the basis of this qualitative differences in pharmacodynamical action may be understood.

According to the theory of EASSON and STEDMAN the alcoholic hydroxylgroup of the d-isomers of adrenaline and adrenaline substitutes cannot get into close attachment with its specific receptor and therefore the physiological action of the d-isomer will be the same as of a compound lacking the alcoholic hydroxylgroup. Generally the loss of this group in sympathomimetic amines increases the stimulating activity and decreases the inhibiting activity on isolated intestine. Thus, it will be expected that the d-isomers will possess greater stimulating and less inhibiting activity than the l-isomers and this holds true for adrianol, corbasil and sympatol.

A more direct confirmation of the theory may be gained by comparing the action of a d-isomer with that of the corresponding compound lacking the alcoholic hydroxylgroup. Thus, according to EASSON and STEDMAN the action of d-sympatol (I.) should be identical with that of a compound II. The only difference between the compound II. and veritol (III.) is the presence in veritol of a methyl-group in  $\beta$ -position, and it may be presumed that this difference has no significant influence on the activity on isolated

intestine. Indeed a remarkably close agreement was observed between the effects on isolated intestine of d-sympatol and dl-veritol.



It remains to explain, why an inactivation of the alcoholic hydroxylgroup is followed by very different changes in the inhibiting activity. Thus, the activity of adrianol is diminished to 1/10000, of adrenaline to 1/10, of corbasil to 1/200 and of sympatol to 1/2, while the activity of ephedrine remains unchanged. The difference between adrenaline and adrianol seems to be particularly peculiar, as these drugs qualitatively have the same action.

A new theory has been developed (ORZECOWSKI, GRONEMEYER and MALORNY 1940, MALORNY and ORZECOWSKI 1940) to explain the antagonism between sympathomimetica and sympathicolytica. According to this both groups attack the sympathetic receptors. The drugs, which antagonize adrenaline, are characterized by having great "Haftfähigkeit" to, but only inconsiderable stimulating power on the sympathetic receptors. MALORNY and ORZECOWSKI have applied this theory to the antagonizing effect of veritol towards adrenaline on isolated intestine, and it seems to me that the above mentioned experiences with d-adrianol and d-corbasil may be well understood on the basis of this view. It may be presumed that d-adrianol has a rather great "Haftfähigkeit" to the sympathetic receptors, thus blocking them without stimulating them and therefore without affecting the intestinal motility. d-Corbasil on the other hand has too little "Haftfähigkeit" to the receptors to block them and therefore the action of adrenaline is not decreased.

The peculiar fact that the inhibiting action of l-corbasil contrary to that of l-adrenaline or l-adrianol is not abolished by d-adrianol remains unexplained. However, during the above

mentioned investigation of the influence of sympathicolytica on the smooth muscle actions of adrenaline substitutes it has been found that generally it is more difficult to antagonize the inhibiting action of 1-corbasil on isolated intestine with sympathicolytic drugs than that of 1-adrenaline or 1-adrianol.

As far as the present author knows, it has not been found previously that one optical isomer of a drug, itself being inactive, completely abolishes the action of the other isomer.

The inhibiting effects on isolated intestine of on the one hand adrianol and corbasil and on the other sympatol and ephedrine are qualitatively quite different, which is evident already from their different appearances. CHEN and SCHMIDT explain the inhibiting effect of ephedrine by the assumption that ephedrine stimulates the sympathetic nerve endings. Contrary to this TAINTER and SEIDENFELD interpret the inhibiting effect of sympatol as caused by muscular depression; the same view is held by KINOSHITA as to the action of large doses of ephedrine. In agreement with these authors I consider the inhibiting effect of sympatol and ephedrine on isolated intestine as due not to stimulation of the sympathetic nerve endings but to direct muscular depression accompanied by blocking of the sympathetic receptors.

### Summary.

1. The action of the optical isomers of adrianol, corbasil, sympatol and ephedrine on isolated rabbit's intestine has been studied.

2. The l-isomers of adrianol, corbasil and sympatol inhibit the intestine in all conc., whereas the d-isomers stimulate the intestine in small doses and inhibit it in larger ones.

3. The l-isomers of adrianol, corbasil and sympatol have a greater inhibiting activity than the d-isomers. Thus l-adrianol is 10 000 times as active as d-adrianol, 1-corbasil 200 times as active as d-corbasil and 1-sympatol 2 times as active as d-sympatol.

4. l-, dl- and d-Ephedrine are equally active on isolated intestine, stimulating it in small doses and inhibiting it in larger ones.

5. Considering the stimulating effect of d-adrianol, d-corbasil and d-sympatol on the intestine as well as the different ratios between the activities of the isomers on blood pressure respective



on isolated intestine, it is concluded that there is a *qualitative* difference in the mode of action of the optical isomers of the investigated drugs.

6. Without itself affecting the motility of the intestine d-adrianol abolishes the inhibiting effect of l-adrenaline and l-adrianol but does not diminish the response to l-corbasil.

7. The theoretical interpretation of the different pharmacodynamical action of enantiomorphous compounds is discussed.

### References.

- AHLGREN, G., Skand. Arch. Physiol. 1929. 58. 95.  
 AUMANN, K. W. and W. B. YOUMANS, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 1939. 42, 11.  
 BOYD, E. M., J. Pharmacol. 1937. 60. 174.  
 CHEN, K. K., C. WU and E. HENRIKSEN, Ibidem 1929. 36. 363.  
 —, and A. LING CHEN, J., Amer. Pharm. A. 1933. 22. 813.  
 —, and C. F. SCHMIDT, Medicine 1930. 9. 11.  
 CURTIS, F. R., Lancet 1928. 2. 226.  
 CUSHNY, A. R., Biological relations of optically isomeric substances, London 1926.  
 DRAKE, M. E., R. JOHN, F. RENSHAW and C. H. THIENES, Arch. int. Pharmacodyn. 1939. 61. 494  
 EASSON, L. H., and E. STEDMAN, Biochem. J. 1933. 27. 1257.  
 EHRLSMANN, O., and G. MALOFF, Arch. exp. Path. Pharmacol. 1928. 136. 172.  
 ERLÉNMEYER, E., Biochem. Z. 1919. 97. 261.  
 GOTTLIEB, R., Arch. exp. Path. Pharmacol. 1923. 97. 113.  
 HOSKINS, R. G., Amer. J. Physiol. 1911—12. 29. 363.  
 HOYT, E., P. PATEK, and C. H. THIENES, Arch. int. Pharmacodyn. 1934. 47. 227.  
 KINOSHITA, M., Jap. J. med. Sci. Pharm. 1930—31. 6. 69.  
 KREITMAR, H., Münch. med. Wschr. 1927. 74. 190.  
 KUSCHINSKY, G., Arch. exp. Path. Pharmacol. 1930. 156. 290.  
 —, and K. OBERDISSE, Ibidem 1931. 162. 46.  
 LASCH, F., Ibidem 1927. 124. 231.  
 LINDNER, W., and K. GÖPFERT, Ibidem 1938. 188. 675.  
 MALORNY, G., and G. ORZECOWSKI, Ibidem 1940. 196. 245.  
 MODERN, F. S., and C. H. THIENES: Arch. int. Pharmacodyn. 1936. 53. 413.  
 NUKITA, Y., Folia pharmacol. Japon. 1935. 20. 153. Through Chem. Abstr. 1935. 29. 7487.  
 ORZECOWSKI, G., W. GRONEMEYER, and G. MALORNY, Arch. exp. Path. Pharmacol. 1940. 196. 237.  
 PAK, C., and B. E. READ, Chin. J. Physiol. 1928. 2. 435.  
 PASTEUR, M., C. R. Acad. Sci., Paris 1886. 103. 138.

TASHIRO, K., *Tohoku J. exp. Med.* 1921. *1*. 102.

PATEK, P., and C. H. THIENES, *Arch. int. Pharmacodyn.* 1934—35. *49*. 432.

SCHAUMANN, O., *Arch. exp. Path. Pharmac.* 1928. *138*. 208.

—, *Ibidem* 1931. *160*. 127.

—, *Med. und Chem.* 1936. *3*. 383.

TAINTER, M. L., and M. A. SEIDENFELD, *J. Pharmacol.* 1930. *40*. 23.

—, and A. B. STOCKTON, *Amer. J. med. Sci* 1933. *185*. 832.

TERADA, Y., *Nagoya Igakkai Zasshi*, 1939. *49*. 91. Through Nagoya J. med. Sci. 1939. *13*. 318.

THIENES, C. H., *Arch. int. Pharmacodyn.* 1934. *47*. 453.

WEBER, W., *Die Beeinflussung der Wirkung von Adrenalin, Corbasil, Sympathol, Veritol und Ephedrin am isolierten Kaninchendünndarm durch Ascorbinsäurezusatz*, Göttingen 1939. Diss.

---



# Experimentelle Untersuchungen über den diabetogenen Faktor des Hypophysenvorderlappens.

Von

N. ERIK LUNDBERG und STINA THYSELIOUS-LUNDBERG.

(Eingereicht am 5. Dezember 1941.)

---

Der sogenannte diabetogene Faktor des Hypophysenvorderlappens (HOUSSAY) verursacht an dem normalen Tier erhöhten Blutzuckergehalt und Glukosurie; andererseits hat Hypophysektomie eine Senkung des Blutzuckergehaltes, sowie erhöhte Empfindlichkeit gegen Insulin und Adrenalin zur Folge, letzteres jedoch ohne Glukosurie mit sich zu führen. Dieses soll auf verminderte Kohlenhydratbildung aus Eiweisstoffen zurückzuführen sein. Reimplantation von Hypophyse (oder Injektion von Hypophysenextrakt) stellt den Normalzustand des Tieres wieder her.

Die Glykogenese in der Leber wird durch Hypophysektomie herabgesetzt, durch Zufuhr von Hypophysenextrakt oder Implantation von Hypophyse erhöht. Hiernach würde also die Empfindlichkeit eines Tieres gegen Insulin nach Entfernung der Hypophyse — wenigstens teilweise — auf der Unfähigkeit der Leber beruhen, eine ausreichende Menge Blutzucker zur Vermeidung von Hypoglykämie zu mobilisieren.

Die Bedeutung des Vorderlappens für den Kohlenhydratstoffwechsel des Organismus geht praktisch klinisch u. a. aus den Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels hervor, die fast alle Krankheiten mit pathologischen Veränderungen des Vorderlappens zeigen.

Während der Jahre 1940—41 haben wir uns mit experimentellen Untersuchungen über den Verlauf der sogenannten diabetogenen

Hypophysenwirkung beschäftigt und dabei die Resultate nach den Veränderungen der Blutzuckerwerte beurteilt. Der 1. Teil der Untersuchungen wurde im Februar und März 1940 im Zoophysiologischen Laboratorium zu Kopenhagen (Prof. A. KROGH) durchgeführt. Er umfasst im wesentlichen die Bedeutung der Nebennieren für die betreffende Hypophysenwirkung. Der 2. Teil, ausgeführt während der Monate Dezember 1940—März 1941 an dem Wenner Gren-Institut der Universität Stockholm (Prof. J. RUNNSTRÖM), behandelt die Frage der hypophysären Kohlenhydratwirkung auf Mark und Rinde.

Als Versuchstiere wurden Frösche und Kröten im Winterstadium benutzt, und zwar für den 1. Teil *Rana esculenta*, für den 2. *Rana temporaria* und *Bufo vulgaris*. Die verschiedenen ausgeführten Operationen bedürfen keiner weiteren Erörterung; es sei nur bemerkt, dass die Nebennierenextirpation bei diesen Tieren durch Nefrektomie geschehen muss, da hier die Nebennieren in die Nieren eingeschlossen sind. Diese Operation ist die einzige, die den Allgemeinzustand der Tiere objektiv nennenswert beeinflusste. Dies äusserte sich u. a. in herabgesetzter Lebhaftigkeit und einem allgemeinen Ödem, das während 2—3 Tage eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 16 % verursachte. Der Winterzustand der Versuchstiere brachte gleichbleibende Einflüsse der Sexualsphäre und der Thyreoidea mit sich; hierdurch waren sämtliche Tiere auch seit Monaten ohne Nahrungszufuhr.

Die notwendigen Operationen wurden unter Uretannarkose ausgeführt. Das Blut wurde dem Herzen entnommen und dadurch das Tier getötet. Der Blutzuckergehalt wurde, in den meisten Fällen an doppelten Ansätzen, nach HAGEDORN bestimmt. Der normale Blutzuckerwert war für *Rana esculenta* (5 Tiere) in Kopenhagen im März 45 mg % ( $\pm 0.9$ ). In Stockholm betrug er während Dezember—März für *Rana temporaria* und *Bufo vulgaris* (10 Tiere) durchschnittlich 28 mg % ( $\pm 3.2$ ). (Der Blutzuckergehalt des Frosches scheint während der Wintermonate sich niedriger zu halten, um gegen das Frühjahr hin anzusteigen). Zwischen Fröschen und Kröten hat sich weder in den Normalwerten noch in der Art zu reagieren, irgendein Unterschied herausgestellt. Die Anzahl der für jede Bestimmung verwendeten Tiere variierte zwischen 3 und 10. Für die gesamte Untersuchung kamen etwa 400 Tiere zur Verwendung.

Von den in Kopenhagen ausgeführten Versuchen, die an anderem Ort veröffentlicht sind, werden hier nur die mit späteren Untersuchungen in direktem Zusammenhang stehenden referiert. Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 1 zusammengestellt; sie zeigen, dass Hypophysektomie<sup>1</sup> allein nach einem Tag eine Blut-

<sup>1</sup> Wenn im folgenden von Hypophysektomie die Rede ist, wird hiermit immer Vorderlappenextirpation gemeint.

zuckersenkung von 45 auf 31 mg % (7 Tiere) hervorruft. Am nächsten Tage, d.h. 2 Tage nach der Operation steigt der Blutzuckerwert auf 51 mg % (9 Tiere), was sicher als ein Zeichen für eine Einstellungsreaktion zur Wiederherstellung des endokrinen Gleichgewichts zu betrachten ist. *Die den Blutzuckerwert regulierende Funktion des Vorderlappens wird also von einem anderen Organ übernommen.*

Tabelle 1.

*Blutzuckerwerte in mg % in März 1940.*

	Nach 1 Tag A	Nach 2 Tagen B.	Differenzen
<i>Normalwert = 45.0 (<math>\pm 0.9</math>)</i>			
1. Hypophysektomie	30.6 ( $\pm 5.8$ )	50.9 ( $\pm 4.9$ )	
2. Hypophys- + Nefrektomie (Nebennierenextirpation)	30.8 ( $\pm 4.4$ )	20.6 ( $\pm 2.4$ )	1B-2B=30.8 ( $\pm 5.5$ )
3. Hypophysenimplantation auf hypophysektomierte Tiere	68.5 ( $\pm 6.8$ )		
4. Hypophysenimplantation auf hypophys- + nefrektomierte Tiere	30.5 ( $\pm 1.5$ )		3A-4A=38.0 ( $\pm 6.5$ )
5. Preloban inj. in hypophysektomierte Tiere	56.6 ( $\pm 3.7$ )		
6. Preloban inj. in hypophys- + nefrektomierte Tiere	25.8 ( $\pm 1.7$ )		5A-6A=30.8 ( $\pm 4.1$ )

Die Annahme, dass die Nebennieren hier eine Rolle spielen, liegt an der Hand. Dies geht auch aus unseren Versuchen mit gleichzeitiger Hypophysektomie und Nefrektomie hervor: am Tag nach der Operation ist der Blutzuckergehalt auf 30 mg % (4 Tiere) gesunken, d. h. *um denselben Betrag wie bei alleiniger Hypophysektomie.* Am folgenden Tag liegt jedoch anstatt der Einstellungsreaktion, die auf Entfernung des Vorderlappens allein eintritt, eine fortgesetzte Blutzuckersenkung bis auf 21 mg % (6 Tiere) vor, oder im Vergleich mit dem Blutzuckerwert des entsprechenden Tages bei nur Hypophysektomie ein Unterschied von nicht weniger als 30.3 ( $\pm 5.5$ ) mg %.

HOUSSAY hat — zur Demonstration der Einwirkung seines diabetogenen Vorderlappenhormons — Vorderlappen in hypophysektomierte Tiere reimplantiert und konnte im Anschluss hieran eine Blutzuckersteigerung zeigen. Wir haben HOUSSAY's Versuche mit derselben Technik wiederholt und erhielten nach einem Tag einen durchschnittlichen Blutzuckergehalt von 68.5 mg % ( $\pm 6.3$ ),

also einen bedeutend höheren als den normalen Ausgangswert von 45 mg %, was einen Unterschied von 23.5 ( $\pm$  6.4) mg % bedeutet.

Versuche, die Hypophyse anstatt durch Implantation durch Injektion des Extraktes Preloban (BAYER) zu ersetzen, führten zu demselben Ergebnis (S. Tab. 1).

Entfernt man indessen auch die Nebennieren (Hypophysektomie + Nefrektomie) und implantiert den Hypophysenvorderlappen in derart operierte Tiere, dann *bleibt nicht nur die eben genannte Blutzuckererhöhung aus*; der Blutzuckergehalt erreicht nicht einmal den normalen Wert, sondern *hält sich auf demselben niedrigen Niveau*, 30 mg %, das er am Tage nach der kombinierten Hypophysen- und Nefrektomie erreichte. Diese Versuche zeigen also unzweideutig, dass *die sogenannte diabetogene Wirkung des Hypophysenvorderlappens mit grösster Wahrscheinlichkeit an die Anwesenheit der Nebennieren geknüpft ist*.

Darauf untersuchten wir, welcher Teil der Nebennieren, — Rinde oder Mark — als Träger dieser Fähigkeit, den Kohlenhydratumsatz zu beeinflussen, anzusehen ist. Als Rindenhormonpräparat verwendeten wir ein von SCHERING speziell für uns hergestelltes, wasserlösliches Cortiron-Präparat (in Glycerindiäthyläther), das uns freundlicherweise kostenlos zur Verfügung gestellt wurde, wofür wir hier herzlich danken möchten. Als Adrenalin-Präparat benutzten wir das synthetische sogenannte »Exadrin« der schwedischen Firma Astra. Auch hierfür sprechen wir unseren besten Dank aus. Diese beiden Präparate haben wir 1) in unoperierte, 2) in nur hypophysektomierte und 3) in sowohl hypophysektomierte wie auch nefrektomierte Tiere injiziert.

Von dem Cortiron-Präparat wurden 2—3 mg Adrenalin, teils 0.4—0.5, teils 0.8—1.0 mg verabreicht. Die Cortironversuche sind in Tab. 2 zusammengestellt; die beiden Gruppen von Adrenalinversuchen sind getrennt aufgestellt in Tabelle 3.

Betrachten wir zunächst die Adrenalinversuche, so scheint die Dosis von 0.8—1.0 mg unphysiologisch hoch zu sein:<sup>1</sup> sie scheint eine unmittelbare antagonistische Wirkung (Gegenreaktion) hervorzurufen. Es lässt sich sonst schwer erklären, warum die Werte nach einer Stunde (bei sowohl unoperierten als auch hypophysektomierten und hypophys- und nefrektomierten Tieren) stets niedri-

<sup>1</sup> Aus diesem Grunde sind die Versuche mit dieser Dosis nicht so weitgehend durchgeführt wie mit der niedrigeren.

ger liegen, als die durch die halbe Dosis verursachten. Später stellt sich deutlich ein Gleichgewicht ein.

Tabelle 2.

Versuche mit Cortiron.

(Blutzuckerwerte in mg %.)

Zeit in Std. nach Injek.	Unoperiert	Nefrektomie <i>11.1 (±3.3)</i>	Hypophysek- tomie <i>2.0 (±6.2)</i>	Hypophys- + Nefrektomie <i>6.3 (±3.6)</i>
(Ausgangswerte)	28.0 (± 3.2)	17.9 (±0.9)	30.6 (±5.3)	21.3 (±1.6)
1 1/2—2 . . .	71.3 (± 3.4) <i>43.3 (± 4.7)</i>	35.0 (±0.1) <i>17.1 (±0.3)</i>		17.7 (±2.3) <i>3.6 (±2.8)</i>
2 1/2 . . . . .		53.0 (±0.1) <i>35.1 (±0.3)</i>		
3—3 1/2 . . .	107.0 (±17.5) <i>79.0 (±17.8)</i>	64.8 (± 2.8) <i>46.8 (±2.9)</i>	42.7 (± 2.6) <i>12.2 (±5.9)</i>	38.5 (± 1.6) <i>17.2 (±2.2)</i>
4—4 1/2 . . .		28.7 (±5.8) <i>10.8 (±5.9)</i>		27.5 (±0.1) <i>6.2 (±1.6)</i>
5 . . . . .	48.7 (± 3.7) <i>20.7 (± 4.9)</i>			
Etwa 24 . . .	30.7 (± 2.5) <i>2.7 (± 3.9)</i>	36.7 (±3.7) <i>18.8 (±3.8)</i>	48.8 (±5.3) <i>18.2 (±7.5)</i>	18.0 (±7.5) <i>3.3 (±7.7)</i>

Bem. Die kursiv gedruckten Zahlen geben die Differenzen gegen die Ausgangswerte an: 1) Die der obersten Reihe werden horizontal verglichen und zeigen den Unterschied mit den unoperierten Kontrollen, 2) die übrigen werden vertikal verglichen und zeigen den Unterschied mit den nicht injizierten Tieren nach derselben Operation.

Hiervon und von einer unmittelbaren Erhöhung des Blutzuckers bei den unoperierten Kontrolltieren nach der niedrigeren Dosis abgesehen, zeichnet sich die Adrenalinreaktion jedoch durch eine ziemlich kontinuierliche Blutzuckererhöhung während der ersten 24 Stunden aus, und zwar unabhängig davon, ob nur die Nebennieren oder sowohl Hypophyse wie Nebennieren entfernt worden sind oder nicht. Aus den Adrenalinversuchen können also folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Injektion von Adrenalin ruft bei dem normalen Frosch 2 Typen von Blutzuckererhöhung hervor: a) eine unmittelbare, schnell vorübergehende und b) eine im Laufe der auf die Injektion folgenden 24 Stunden langsam ansteigende.

2. Für die unmittelbare Blutzuckererhöhung ist einerseits eine richtige Dosierung, andererseits die Gegenwart von sowohl Hypophyse als auch Nebenniere erforderlich.



Tabelle 3.  
Versuche mit Adrenalin.  
(Blutzuckerwerte in mg %.)

Zeit in Std. nach Injek.	Unerprobt		Nefrektomie		Hypophys- + Nefrektomie	
	0.4—0.5 mg	0.8—1.0 mg	0.4—0.6 mg	0.8—1.0 mg	0.4—0.5 mg	0.8—1.0 mg
Ausgangswerte . . .	28.0 ( $\pm 3.2$ )		17.9 ( $\pm 0.9$ ) 11.1 ( $\pm 3.3$ )		21.3 ( $\pm 1.6$ ) 6.3 ( $\pm 3.0$ )	
1—1 1/2 . . . . .	84.5 ( $\pm 4.5$ ) 56.5 ( $\pm 5.5$ )	41.0 ( $\pm 1.0$ ) 13.0 ( $\pm 3.4$ )	50.0 ( $\pm 1.0$ ) 32.1 ( $\pm 1.3$ )	34.0 ( $\pm 1.7$ ) 16.1 ( $\pm 1.0$ )	41.0 ( $\pm 4.0$ ) 19.7 ( $\pm 4.3$ )	28.3 ( $\pm 1.3$ ) 7.0 ( $\pm 2.5$ )
2—2 1/2 . . . . .	56.5 ( $\pm 5.5$ ) 28.5 ( $\pm 6.4$ )	61.5 ( $\pm 0.8$ ) 33.5 ( $\pm 3.2$ )	51.7 ( $\pm 3.3$ ) 33.3 ( $\pm 3.4$ )	53.6 ( $\pm 4.7$ ) 55.2 ( $\pm 4.8$ )	48.5 ( $\pm 1.5$ ) 27.2 ( $\pm 2.2$ )	62.3 ( $\pm 7.4$ ) 41.0 ( $\pm 7.0$ )
3—3 1/2 . . . . .	44.0 ( $\pm 7.0$ ) 16.0 ( $\pm 7.7$ )	51.0 ( $\pm 4.0$ ) 23.0 ( $\pm 5.1$ )	66.0 ( $\pm 5.6$ ) 48.1 ( $\pm 5.7$ )		80.3 ( $\pm 11.0$ ) 59.0 ( $\pm 11.1$ )	73.0 <sup>1</sup> 51.7 <sup>1</sup>
4—4 1/2 . . . . .				44.5 ( $\pm 4.5$ ) 26.0 ( $\pm 4.0$ )	83.0 ( $\pm 1.0$ ) 61.7 ( $\pm 1.0$ )	42.5 ( $\pm 4.5$ ) 21.2 ( $\pm 4.8$ )
Ges. 24 . . . . .	141. ( $\pm 10.4$ ) 113. ( $\pm 10.0$ )	124. ( $\pm 12.6$ ) 96. ( $\pm 13.0$ )	131. <sup>1</sup> 103.1 <sup>1</sup>		101.0 ( $\pm 1.9$ ) 79.7 ( $\pm 2.5$ )	

Bem. Die *kursiv* gedruckten Zahlen geben die Differenzen gegen die Ausgangswerte an: 1) Die der obersten Reihe werden horizontal verglichen und zeigen den Unterschied mit den unoperierten Kontrollen, 2) die übrigen werden vertikal verglichen und zeigen den Unterschied mit den nicht injizierten Tieren nach derselben Operation.

<sup>1</sup> Nur ein Wert.

3. Die sich über 24 Stunden erstreckende Blutzuckererhöhung ist unabhängig von dem Vorhanden- oder Nichtvorhandensein von Hypophyse und Nebennieren.

Ganz anders erscheint die Wirkung der Cortiron-Injektionen auf den Blutzuckergehalt. Hier finden wir bei den unoperierten Kontrolltieren eine Blutzuckersteigerung, die ihr Maximum 3—3½ Stunden nach der Injektion erreicht. Danach sinkt der Wert und ist am folgenden Tag etwa auf das Ausgangsniveau herabgesunken. Das Verhalten der Tiere ohne Nebennieren, *aber mit Hypophyse*, ist hiermit weitgehend übereinstimmend. Dagegen bleibt praktisch jede Blutzuckerreaktion aus, wenn die Hypophyse entfernt ist. *Der Hypophysenvorderlappen scheint somit einen Faktor zu enthalten, von dem die Cortironwirkung — im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der Adrenalinwirkung — abhängig ist.*

### Zusammenfassung.

1. Der Aufsatz enthält einen Bericht über experimentelle Untersuchungen über die Bedeutung der Nebennieren für die sogenannte diabetogene Hypophysenwirkung, wie sie in den Blutzuckerwerten des Frosches zum Ausdruck kommt.

2. Die durch Vorderlappenextirpation hervorgerufene Blutzuckersenkung ist vorübergehend, was darauf schliessen lässt, dass die Einwirkung der Hypophyse auf den Blutzuckergehalt von einem anderen Organ übernommen wird.

3. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist dieses Organ mit den Nebennieren identisch, da die diabetogene Wirkung der Hypophyse an ihre Anwesenheit gebunden ist und mit ihrer Entfernung verschwindet. Dieses Verhalten besteht auch bei Winterfröschen, wenn alle anderen endokrinen Organe — wie Thymus, Pancreas, Sexualorgane — intakt gelassen werden.

4. Implantationsversuche haben gezeigt, dass die Vorderlappenwirkung nicht über direkte Nervenleitung geht.

5. Sowohl Implantation von Hypophyse als auch Injektion von Vorderlappenextrakt (Préloban, Bayer) in hypophysectomierte Tiere bewirken dieselben Verhältnisse wie die Gegenwart der Hypophyse.

6. Die den Blutzuckergehalt erhöhende Wirkung der Nebennieren wird sowohl von Adrenalin als auch von Cortiron hervorgerufen. Zweierlei Arten der Adrenalin-Hyperglykämie werden

bei dem normalen Frosch unterschieden: a) eine unmittelbar einsetzende, schnell vorübergehende, die nur bei Vorhandensein von Hypophyse und Nebennieren auftritt; b) eine im Laufe von 24 Stunden langsam ansteigende, die nicht beeinflusst wird, ob nur die Nebennieren oder Hypophyse und Nebennieren entfernt werden oder nicht.

Die Blutzucker-steigernde Wirkung des Cortirons ist an die Gegenwart des Hypophysenvorderlappens gebunden, was für das Vorhandensein eines cortikotropen Vorderlappenhormons zu sprechen scheint.

---

## Über die Einwirkung von Kopulation und Ablaichen auf den Blutzuckergehalt des Frosches.

Von

ERIK LUNDBERG und STINA THYSELIUS-LUNDBERG.

(Eingereicht am 5. Dezember 1941.)

Unsere früheren Blutzuckeruntersuchungen wurden an Fröschen ausgeführt, die sich im Winterzustand befanden. Wenn im Laufe der Arbeit das Frühjahr und damit die Laichzeit herannahte, fingen die Kontrollwerte derart an zu schwanken, dass sämtliche während dieser Zeit erhaltenen Untersuchungsergebnisse — jedenfalls in dem Zusammenhang und unter den Voraussetzungen, unter denen sie zustande gekommen waren — unbrauchbar wurden. Es erwies sich zunächst als notwendig, das Verhalten des Blutzuckers des Frosches systematisch während der Zeit um die Kopulation herum zu untersuchen. Es ist uns nicht gelungen, in der Literatur Angaben über die Einwirkung der Kopulation auf die Blutzuckerregulation zu finden, weder für Frösche noch für andere Tierarten.

Die Untersuchungen wurden während des kurzen Frühjahrs und Vorsommers 1941 nach dem in Schweden strengen Winter ausgeführt, der offenbar die Kondition des Materiales herabgesetzt und den Bestand dezimiert hatte. Schon vor Beginn der Laichzeit scheint der Blutzuckergehalt des Frosches von einem Minimumwert während des Winterschlafes zu steigen: Während der Wintermonate 1941 in Stockholm fanden wir durchschnittlich 28 mg % ( $\pm 3.2$ ) an 10 Tieren; im Mai 42 mg % ( $\pm 0.5$ ) an 9 Tieren. In Kopenhagen war der Blutzuckergehalt im Frühjahr 1940 45 mg % ( $\pm 0.9$ ). Zwischen männlichen und weiblichen Tieren konnte kein Unterschied nachgewiesen werden.

Der den Winterzustand der Tiere kennzeichnende Zustand fehlender Nahrungsaufnahme wurde über die ganze Zeit, in der die Versuche ausgeführt wurden, ausgedehnt. Auch im übrigen sind die Versuchsanordnungen dieselben wie bei den vorhergehenden Untersuchungen (S. 290).

*Schwankungen des Blutzuckergehaltes in mg % bei normalen Fröschen in Zusammenhang mit der Kopulation und Eiablage.*

	Männchen	Weibchen
Nw. vor der Kopulation . . . .	45, 44, 39, 46, 42, 38, 40, 40 $M=42 (\pm 1.0)$	45, 39, 44, 36, 42, 42, 43 $M=41.5 (\pm 1.2)$
während d. Kopulation vor der Eiablage . . . . .	49, 49, 43, 47, 45 $M=47 (\pm 1.2)$	44, 45, 33, 42, 45, 43, 36, 44 $M=42 (\pm 1.0)$
während d. Eiablage . . .	71, 56, 52, 55, 61 $M=59 (\pm 3.3)$	57, 59, 56, 84, 60, 61 $M=63 (\pm 4.3)$
nach Abschluss d. Kopulation Unmittelbar . . . . .	23, 29, 28 $M=27 (\pm 1.0)$	26, 16, 21 $M=21 (\pm 2.8)$
nach 24 Stunden . . . . .	33, 33, 36, 25, 37, 28, 26, 33, 37, 30, 32, 34, 49 $M=33 (\pm 1.7)$	28, 33, 33, 26 $M=30 (\pm 1.9)$

Die Untersuchungsergebnisse sind in der obenstehenden Tabelle zusammengestellt, wo die gefundenen Blutzuckerwerte nach verschiedenen Phasen des Kopulationsvorganges eingeteilt sind. Zu oberst finden sich die normalen Werte *vor dem Zusammenbringen der Tiere* in dasselbe Gefäß. Ist bis zum nächsten Tag keine Kopulation eingetreten, so gehören sie der Gruppe Nw, normale Werte vor der Kopulation, an.

Nach Eintritt der Kopulation findet sich a) eine Gruppe *vor dem Abblachen*, b) eine Gruppe *gerade während des Abblachens*. Unmittelbar danach findet die spontane Auflösung der Kopula statt. Wir haben dann die Tiere *teils* nach einigen Stunden, *teils* nach 24 Stunden untersucht.

Für die während der Kopulation ausgeführten Versuche mussten die Tiere auseinander gezogen werden. Die Muskelaktivität

der Männchen ist bekanntlich während der Kopulation recht bedeutend, besonders verglichen mit der der Weibchen, die sich in dieser Hinsicht passiv verhalten. Was der Glykogenverbrauch im Zusammenhang mit dieser Muskulararbeit für das Blutzuckerniveau zu bedeuten hat, lässt sich schwer sagen. Verschiedene andere, gleichzeitig sich abspielende Vorgänge können hier auch einen Einfluss auf den Blutzuckergehalt ausüben. Von entscheidender Bedeutung kann jedoch diese Muskulararbeit kaum sein, da — wie wir unten sehen werden — die Kurven der Männchen und der Weibchen einen gleichen Verlauf zeigen.

*Weibchen:* Das Zusammenbringen mit den Männchen, sowie der Eintritt in die Kopulation hat *vor dem Abbläuen* keine Veränderung des Blutzuckergehaltes zur Folge. Mit dem Abbläuen tritt jedoch eine steile Blutzuckersteigerung ein (Von 42 mg % auf 63 mg %). Auf diese hohen Blutzuckerwerte folgt unmittelbar (3—4 Stunden) nach Abschluss der Eiablage eine Blutzuckersenkung, die sogar stärker als die vorangehende Erhöhung ist und bis weit unter den Ausgangswert abfällt (bis auf 21 mg %). Nach 24 Stunden ist der Wert wieder auf 30 mg % gestiegen und liegt aber immer noch unter dem (normalen) Ausgangswert vor Eintritt der Kopulation.

*Männchen:* Bei den Männchen verläuft die Blutzuckerkurve während der Kopulation im grossen und ganzen wie bei den Weibchen; sie zeigt sowohl dieselbe Erhöhung während der Eiablage wie auch die starke Senkung unmittelbar nach Auflösen der Kopula. Schon während der 1. Phase der Kopulation und vor Anfang der Eiablage findet sich eine Andeutung von Blutzuckererhöhung (Von 42 mg % auf 47 mg %), die bei den Weibchen fehlt. Dann steigt der Blutzuckergehalt gleichzeitig mit der Eiablage auf 59 mg %, um nach Auflösung der Kopula auf 27 mg % zu fallen, ein Wert, der — wie bei den Weibchen — unter dem Ausgangswert liegt. Nach Verlauf von 24 Stunden beträgt der Blutzuckergehalt 33 mg %.

Hierauf fingen wir mit entsprechenden Untersuchungen an hypophysektomierten Tieren an. Da jedoch 1940 nur eine so kurze Zeit zur Verfügung stand, konnte keine ausreichende Anzahl von Versuchen für jede Gruppe ausgeführt werden, und sie werden deswegen im Frühjahr 1942 fortgesetzt. Aus den bisher vorliegenden Ergebnissen scheint jedoch hervorzugehen, dass die Gegenwart des Vorderlappens von wesentlicher Bedeutung auch für den Ver-

lauf der Blutzuckerkurve während der Kopulation ist. Dagegen scheint eine einige Tage vor der Kopulation vorgenommene Hypophysektomie weder auf die Kopulationsfrequenz noch auf die Eiablage oder Befruchtung einzuwirken. Sowohl bei den Kontrollen wie auch bei den operierten Tieren waren etwa 33 % der abgelegten Eier befruchtet, was wohl auf die niedrige Temperatur während des kalten und langen Frühjahrs 1941 zurückzuführen ist.

Aus dieser Untersuchung geht hervor, dass die Ablage der Geschlechtsprodukte bei dem Frosch einen entscheidenden Einfluss auf den Blutzuckergehalt hat; gleichzeitig mit der Eiablage und der Entleerung der Spermaflüssigkeit findet eine ausgesprochene Glykogenmobilisierung und damit eine Zunahme des Blutzuckergehaltes statt. Unmittelbar nach Abschluss der Kopulation folgt eine kompensierende Reaktion, die in einer hochgradigen Blutzuckersenkung zum Ausdruck kommt. Hierauf scheint der Blutzuckergehalt eine Tendenz zu zeigen, sich dem Normalwert wieder zu nähern. Dieses gilt für beide Geschlechter.

## Temporal Sequence of Component Potentials in the Frog's Retina and the Electrotonic Potential in the Optic Nerve.

By

C. G. BERNHARD.

(Received 11 December 1941.)

---

Since the publication of GRANIT and RIDDELL'S (1934) preliminary analysis of the component potentials in the frog's retina a number of new facts and new technical possibilities have turned up which necessitate revision of their diagram.

There is (i) the demonstration by GRANIT and THERMAN (1937) that the off-effect of the frog's eye also contains a renewed rise of the positive component  $P_{II}$  and not merely return to the baseline of the negative component  $P_{III}$ . This fact has not yet been incorporated in the analysis. (ii) The electrotonic potential in the optic nerve, suggested by the work of GRANIT and THERMAN (1938), has been found by the author (BERNHARD, 1940) who succeeded in establishing that it did not belong to the negative component  $P_{III}$ . In this paper facts will be presented relative to its identification with  $P_{II}$ . (iii) GRANIT and HELME (1939) found at high amplification a small positive rise preceding the off-effect proper in the retina. They did not investigate whether it was due to  $P_{II}$  or  $P_{III}$ , or possibly, to an as yet unidentified component. Below evidence will be given in favour of its identification with  $P_{III}$ . (iv) This raises the question as to the temporal sequence of the component potentials in retina and nerve. It will be shown that  $P_{III}$  precedes  $P_{II}$  at both onset and cessation of illumination, that the electrotonic potential follows after  $P_{II}$  and the discharge in the nerve upon the rising phase of this process.



The results obtained have led to a new diagram, giving a more complete analysis of the complex retinal response than was possible in 1934.

## Method.

A 3-stage push-pull directly coupled amplifier, designed by the physicist of this laboratory, Mr. T. HELME, was available for recording from retina and nerve. The excised frog's eye with its optic nerve attached, but carefully freed from the covering sheath of tissue, was used in all experiments. The latter precaution is necessary in order to avoid purely physical contact spread of current leading to unanalyzably complex potential changes upon illumination. Rather strong stimuli and some light-adaptation have been used on account of their favourable effect upon  $P_{III}$  (cf. GRANIT and RIDELL, 1934).

In the experiments with potassium a 1 % solution of KCl was used in order to remove  $P_{II}$  (THERMAN, 1938).

## Results.

### 1. The Temporal Sequence of the Component Potentials $P_{II}$ and $P_{III}$ .

At onset of illumination: The complex retinal response begins with the negative  $\alpha$ -wave (see fig. 1) of  $P_{III}$  from which  $P_{II}$  rises as the positive  $b$ -wave. Inspection of this phase at very high amplification often reveals an inflexion on the falling phase of the  $\alpha$ -wave from which the fall continues less steeply, finally to leave room for the rising  $b$ -wave.

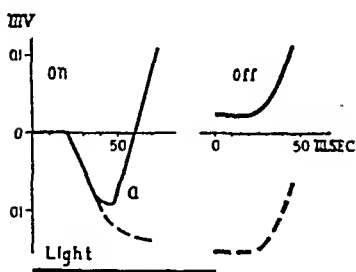


Fig. 1. Redrawn and magnified record of on- and off-deflections to illumination. Line drawn in full: normal complex retinal action potential. Broken line: negative component  $P_{III}$  isolated with potassium chloride.

In order to define this moment precisely I have used THERMAN's method of removing  $P_{II}$  with a drop of a potassium chloride solution into the opened eye. Taking care to illuminate at constant intervals in order to follow the relatively fast disappearance of  $P_{II}$ , and the later, slower diminution of  $P_{III}$ , it is possible to show that the normal complex retinal response and the isolated negative  $P_{III}$  coincide until the moment arrives when the inflexion is seen in the complex response. In the record redrawn

and magnified in fig. 1 the line drawn in full shows the initial phase of the complex response with the inflexion near the bottom of the  $a$ -wave (cf. also fig. 4 a, b). The latter continues after treatment with potassium chloride (broken line) directly as the negative component  $P_{III}$  and the two curves diverge at the point where in the complex response the inflexion is found. From this fact it is concluded that  $P_{II}$  rises at this moment and, hence, that  $P_{III}$  precedes  $P_{II}$ .

The same method may be used to demonstrate the nature of the first positive rise at »off», seen only at high amplification, and visible in record b of fig. 2 and in record a of fig. 4. In fig. 1 the normal complex response shows at »off» this slow initial rise followed by the fast rise which alone dominates the off-effect at standard amplification. The first phase is still better delimited from the rest of the curve in record b of fig. 2. After treatment with potassium chloride, leaving only the negative  $P_{III}$ , the slow first phase of the off-effect does not disappear when  $P_{II}$  diminishes ultimately to disappear altogether. The latent period for the return to the baseline of the negative  $P_{III}$  all the time remains constant. Hence the off-effect just as the on-effect begins with a change in the negative  $P_{III}$  though at »off» in a direction opposite to the one at »on».  $P_{III}$  swings down at onset and up at cessation of illumination when the records are reproduced in the standard manner.

Thus, at both »on» and »off» development respectively disappearance of  $P_{III}$  precedes  $P_{II}$ .

## 2. The Electrotonic Potential in the Optic Nerve.

Records c and d of fig. 2 show for respectively »on» and »off» the electrotonic potential led off from the optic nerve. The electrode towards the eye is negative for a potential change upwards. Upon this slow change is superimposed the impulse discharge. It is a striking fact that the large  $a$ -wave in the retina, shown above as record a, does not penetrate to the nerve. By utilizing the fact (GRANT and RIDELL, 1934) that  $P_{III}$  can be activated by reillumination upon the off-effect, as in e of fig. 2, in the shape of a particularly large  $a$ -wave, it is possible not only to confirm the absence of this wave in the optic nerve record (f) but also to show that the electrotonic potential cannot be due to the summed effects of discrete impulses (cf. BERNHARD, 1940). This re-

evoked *a*-wave, as we know (GRANIT and THERMAN, 1935, HARTLINE, 1938), is accompanied by inhibition. Nevertheless the electrotonic potential remains above the baseline uninfluenced by inhibitory removal of the great majority of spikes. The re-evoked *a*-wave is followed by a *b*-wave which always is accompanied by electrotonic potential in the nerve (record f).

Can the electrotonic potential be an outflow into the nerve of the *b*-wave and hence of  $P_{II}$ ? It is certain that simple physical

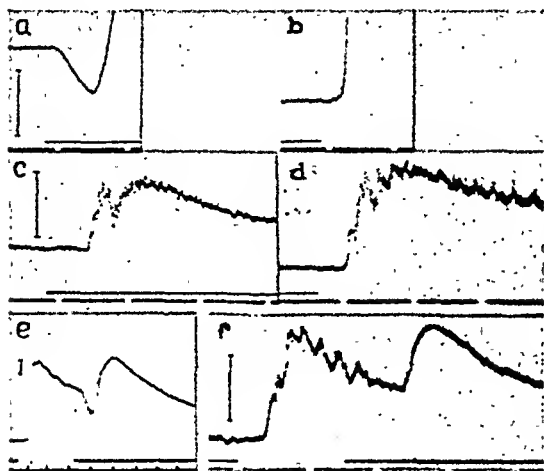


Fig. 2. Oscillograph records from retina and optic nerve. a and b: on- respectively off-deflexions from retina at high amplification; c and d: slow electrotonic potential and spike activity in the optic nerve at on- and off-illumination; e and f: effect of re-illumination in (e) retina and (f) optic nerve. See text. Time in  $\frac{1}{8}$  sec. Calibration in all records marked for 0.1 mV.

spread does not explain its presence in the nerve since every method of killing the nerve between the retina and the recording electrodes on the latter, without interrupting the physical contact, removes every change of potential in the optic nerve (BERNHARD, 1940). This is also shown in fig. 4 d. On the other hand, the electrotonic potential in the optic nerve is more sensitive to cocaine than the corresponding phenomenon in the roots (BARRON and

MATTHEWS, 1935) and it is difficult to be certain as to whether spike activity disappears before the electrotonic potential or not.

One way of attacking the question concerning the relation between  $P_{II}$  and the electrotonic potential is to use GRANIT and THERMAN'S (1937) method of throwing in a flash of light upon an already illuminated eye just before interrupting the illumination in order to elicit the off-effect. The flash initiates a small *b*-wave of positive  $P_{II}$ . Inasmuch as the off-effect contains  $P_{II}$  and not only return of the oppositely directed  $P_{III}$  this fraction of it is then occluded by the wake of »refractoriness» left by the flash. Is there under identical conditions occlusion of both  $P_{II}$  and the electrotonic potential?

An experiment designed to answer this question is shown in fig. 3. In this figure the results with the retina are plotted to the left, those with the nerve to the right. *A* is the off-effect alone. Then a 1/10 sec. flash of 100 times the intensity used for eliciting the retinogram is thrown in upon the latter just before the off-effect as a consequence of cessation of illumination is released. The effect of this flash alone is shown in record *B*. In curve *C* the flash precedes the off-effect of the weaker light by 150 msec.

The curve for the flash control is continued as the broken line. The off-effect has undergone a considerable reduction. The broken line of curve *D* traces the off-effect, preceded by the flash, as obtained after subtraction of the potential caused by the latter, and compared with the normal off-effect drawn in full. The series *E—H* illustrates the same experiment with leads on the nerve for the electrotonic potential. The shape of the latter is, of course, somewhat modified by spike activity, but it is clear that despite this the curves to the right are a replica of those to the left.

The electrotonic potential passes through the same series of changes as  $P_{II}$ . When the final results of the analysis is compared in curves *D* and *H* the electrotonic potential is seen to be relatively more reduced by the preceding flash than the off-effect in the retina. This is what one would expect considering that the off-effect in the retina also is determined by the return to the baseline of  $P_{III}$  which is lacking in the nerve.

Even if we are entitled to conclude that the electrotonic potential closely reflects changes in  $P_{II}$ , this does not necessitate their identification. A comparison of latent periods may be helpful in this matter. For onset and cessation of illumination this is done in fig. 4. The records *a* for »on» and »off» show facts with

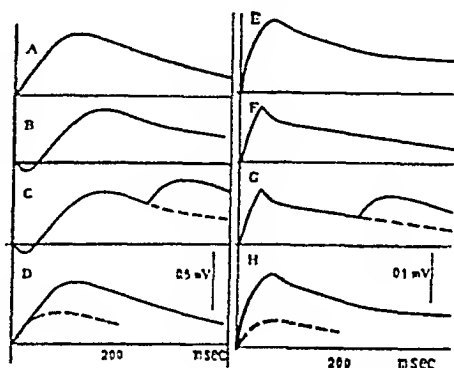


Fig. 3. Comparison of effect of flash at strength 100 preceding cessation of illumination of strength 1 on retina (*A—D*) and optic nerve (*E—H*). *A* and *E*: off-effect alone; *B* and *F*: flash alone; *C* and *G*: flash preceding off-effect by 150 msec; *D* and *H*: line drawn in full shows records *A* and *E*, broken line shows remaining off-effect when following in wake of refractoriness left by the preceding flash (from records *C* and *G*). From the curves *C* and *G* has been subtracted the effect of the flash alone (*B* and *F*). See text.

which we have already become familiar: the  $\alpha$ -wave with its inflexion, and the slow and fast rising phases of the off-effect. The two records b illustrate the removal of  $P_{II}$  with potassium chloride. The records c show the electrotonic potential in the nerve before treatment with potassium chloride, the records d that after this treatment the nerve is silent. A relatively fast film has been used and so it is possible to compare the latencies. Counting the  $b$ -wave ( $P_{II}$ ) from the inflexion on the  $\alpha$ -wave as is justified by comparing records a and b for «on», it is found to be 32–35 msec. as against 20 msec for the  $\alpha$ -wave ( $P_{III}$ ). The electrotonic potential obviously comes much later, after 70–75

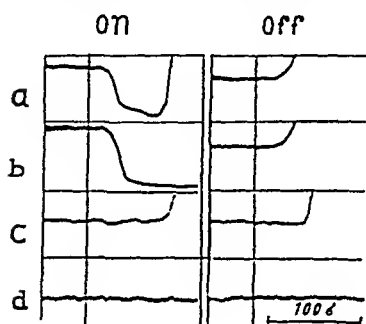


Fig. 4. Analysis of latent period of component potentials at «on» and «off». Records a and b from retina before and after treatment with potassium chloride; c and d from nerve before and after treatment with potassium chloride. Full explanation in text.

msec. At «off»  $P_{III}$  swings back (records a and b) after about 20 msec. It is difficult in this case to say where  $P_{II}$  begins as  $P_{III}$ -off and  $P_{II}$ -off, being potential changes in the same direction, without a definite boundary succeed one another. But also at «off» the electrotonic potential is relatively late. It follows after about 50 msec as compared with 18 msec for  $P_{III}$ .

The earliest spikes are always found on the rising phase of the electrotonic potential.

The remarkably long latency of the electrotonic potential may be held as an argument against its identification with  $P_{II}$ . But the argument is perhaps not conclusive. From the work of BOGUE and ROSENBERG (1934) we know that electrotonic potentials rise along an S-shaped curve in which the initial rise is slower the further the electrodes are shifted from the point where the potential is originated. It is practically certain that the electrotonic potential arises in the ganglion cells and not in the nerve itself, from where it is being led off. Now the fibres begin with a relatively long intraretinal stretch of nerve to which should be added some 3–4 mm inside the blind spot, through the sclera, and out to the point where the electrodes are placed. This must lead to a delay of the electrotonic potential but whether it is sufficient to account for the difference or not is difficult to say. Perhaps the safest conclusion at present is to bear these possibilities in

mind but at the same time to realize that, even if  $P_{II}$  and the electrotonic potential cannot be identified, they must be closely similar processes with respect to their nature and origin.

### Discussion.

The final outcome of this analysis is summarized in the diagram of fig. 5 which is self-explanatory. Illumination of the retina leads to successive potential changes, beginning with  $P_{III}$ , followed by  $P_{II}$ , the electrotonic potential and the discharge in the optic nerve. Considering that the electrotonic potential is led off at some distance from its place of origin it is clear that the impulses in the nerve must follow after the latter.

$P_{III}$  almost certainly must be localized to the receptors. In all known eyes these respond with a large potential change (HARTLINE, 1928, HARTLINE and GRAHAM, 1932, BECK, 1899, FRÖHLICH, 1914, THERMAN, 1940, BERNHARD, 1941 b for various

evertbrates) which in most evertbrate eyes is monophasic (HARTLINE, 1928, BERNHARD, 1941 b) but in *Loligo*, according to THERMAN (1940), consists of two monophasic responses of opposite potential sign. The vertebrate  $P_{III}$  is of opposite sign relative to the isolated retinal response of *Limulus* and *Dytiscus*, and this fact has motivated some hesitation as to whether it could be identified with the typical retinal response of simpler eyes (GRANIT, 1938, GRANIT and HELME, 1939) though it has long been known that this component is more resistant to interfering agents such as cold, asphyxia etc. (cf. GRANIT's summary, 1938). For this reason PIERON and SEGAL (1939) have been inclined to localize it to the receptors. THERMAN's (1940) results with *Loligo* would seem to offer an escape out of this dilemma. If this isolated retina contains two component potentials of opposite sign it is possible that

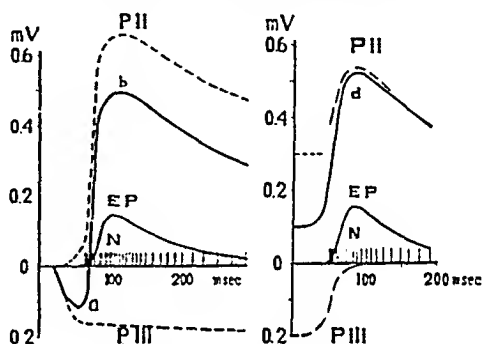


Fig. 5. Analysis of complex electrical response of light-adapted frog's eye. Note, that in this state of adaptation component  $P_I$  is lacking. Course and latent period of  $P_{II}$ ,  $P_{III}$ , electrotonic potential (EP), spike activity (N). The normal complex response from retina alone at on and off is shown by line drawn in full marking  $a$ -wave,  $b$ -wave, and  $d$ -wave or off-effect. Diagram interrupted in the middle.

one of them is more emphasized in some, the other in other types of retinae.

The fact that  $P_{II}$  and the electrotonic potential are so different from  $P_{III}$  but always behave similarly with respect to diverse changes in the experimental conditions together with the further fact that  $P_{III}$  is not carried down to the optic nerve, would seem to necessitate the conclusion that these two potentials,  $P_{II}$  and the electrotonic potential, arise in the same or similar structures, placed distally with respect to those responsible for  $P_{III}$ . Therefore it is assumed that  $P_{II}$  and the electrotonic potential belong to the synaptic layers behind the receptors. The electrotonic potential is probably due to the ganglionic layer.

*Thus excitation in the vertebrate retina takes place by means of a mechanism involving successive slow potential waves, all of which precede the discharge in the optic nerve.*

GRANIT's (see summary, 1938) analysis of the retinal response has led to the knowledge that removal or diminution of  $P_{II}$  leads to removal or diminution of the discharge in the optic nerve. He has also pointed out that selective activation of  $P_{III}$  is accompanied by inhibition (confirmed by HARTLINE, 1938) of spike activity. Later BERNHARD and SKOGLUND (1941) have added the observation that  $P_{III}$  can be greatly reduced by alcohol and that at the same time inhibition diminishes in the optic nerve. Therefore  $P_{III}$  must be held to be necessary for inhibition. BERNHARD, GRANIT and SKOGLUND (1942) have recently in connexion with experiments designed to illustrate nerve as model sense-organ developed the concept that both excitation and inhibition in the retina are caused by slow potentials distributed electrotonically over the retinal neurons. They as well as GRANIT and HELME (1939) have shown how excitation and inhibition can be reproduced by polarization of the retina. They have further pointed out that the exceedingly long latent periods in the retina can be explained by such mechanisms.

If the discharge in the optic nerve were independent of the potential differences originating in the receptors and neurons of the vertebrate eye it would be difficult to understand why it always follows *after* the development of the retinal pattern of slow potentials, involving activation of at least two ( $P_{II}$  and  $P_{III}$ ) and possibly three (electrotonic potential) or more mechanisms in the eye. The very slow change ( $P_I$ ) has no direct con-

nexion with the discharge in the nerve (GRANIT and THERMAN, 1935, cf. also BERNHARD, 1941 a). For this reason it is necessary to regard the slow potentials as part of the »generator mechanism» (BERNHARD, GRANIT and SKOGLUND, 1942) of the retina. BARRON and MATTHEWS (1938) hold similar views with regard to the electrotonic potential of the ventral roots, which there mirror and precede variations in the degree of excitation just as the corresponding phenomenon in the optic nerve does. It is probable that inside the retina excitation is carried forwards by electrotonic spread rather than by spike activity between the different layers.

### Summary.

The temporal sequence of the component potentials  $P_{II}$  and  $P_{III}$  in the retina, the electrotonic potential and the spike activity in the optic nerve has been analyzed for the frog's eye with directly coupled amplifier and oscillograph.

The slow potential changes follow in the sequence:  $P_{III}$ ,  $P_{II}$ , electrotonic potential and spike discharge both at onset and cessation of illumination. Their respective latencies are given for maximal stimuli. A diagram is shown in fig. 5.

The electrotonic potential reproduces the properties of  $P_{II}$ . The theoretical significance of this result is being discussed.

### References.

- BARRON, D. H., and B. H. C. MATTHEWS; *J. Physiol.* 1938. 12. 276  
 BECK, A., *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1899. 78. 129.  
 BERNHARD, C. G.; *Acta physiol. scand.* 1940. 1. Suppl. 1.  
 —, C. G.; *Ibidem.* 1941 a. In print.  
 —, C. G.; *J. Neurophysiol.* 1942. H 5.  
 —, C. G.; R. GRANIT and C. R. SKOGLUND, *Ibidem.* 1942. H 5.  
 —, C. G. and C. R. SKOGLUND; *Acta physiol. scand.* 1941. 2. 10.  
 BOGUE, J. Y. and H. ROSENBERG; *J. Physiol.* 1934. 84. 353.  
 FRÖLICH, F. W.; *Z. Sinnesphysiol.* 1914. 48. 28.  
 GRANIT, R.; *Documenta Ophthalm.* 1938. 1. 7.  
 —, and T. HELME; *J. Neurophysiol.* 1939. 2. 556.  
 —, and L. A. RIDDELL; *J. Physiol.* 1934. 81. 1.  
 —, and P. O. THERMAN; *Ibidem.* 1935. 88. 359.  
 —, *Ibidem.* 1937. 91. 127.  
 —, *Ibidem.* 1938. 93. 9 P.



HARTLINE, H. K., Amer. J. Physiol. 1928. 83. 466.

—, Ibidem. 1938. 121. 400.

—, and C. H. GRAHAM, J. cell. comp. Physiol. 1932. 1. 277.

PIERON, H. et J. SEGAL, C. R. Soc. Biol. Paris. 1939. 81. 1048.

THERMAN, P. O., Acta soc. sci. Fenn. Nova Series B. Tome II. Helsingfors 1938.

—, Amer. J. Physiol. 1940. 130. 239.

— — — — —

From the Biological Institute of the Carlsberg Foundation,  
Copenhagen.

## Blood Coagulation and Species Specificity of Fibrinogen.

By

TAGE ASTRUP and SVEN DARLING.

(Received 13 January 1942.)

---

The influence of an alteration in pH on the action of thrombin on fibrinogen has been investigated several times. In the present paper this relation is investigated for the fibrinogens of ox, chicken, horse and man.

### Experimental.

*Thrombin:* Ox thrombin is prepared according to the method described by ASTRUP and DARLING (1940, 1941). A preparation, thrombin B, containing about 10 thrombin units (t. u.) per mg is used. A solution is made by extraction of thrombin with physiological NaCl, with addition of one drop of octyl alcohol, and centrifuging. *Chicken thrombin* is prepared as described before (ASTRUP (1938)). 50 mg is extracted with 5 ml of physiological NaCl.

*Fibrinogen:* For the preparation of fibrinogen, *Bordet* plasma is used, in which the prothrombin is adsorbed by tricalciumphosphate (ASTRUP (1938)). Together with the prothrombin also thrombokinase is removed, and the fibrinogen prepared from this plasma shows good stability and does not clot by the addition of calcium chloride and thrombokinase. From the plasma, fibrinogen is prepared after MELLANBY's method. The plasma is diluted with 15 parts of distilled water and 1 per cent acetic acid solution is added. The fibrinogen is precipitated best at the following pH values: Ox plasma, pH 5.3; horse plasma, pH 6.2; human plasma, pH 6.4; chicken plasma, pH 5.8. After standing for a short time it is decanted, and then centrifuged. The precipitate is washed 3 times with distilled water and dissolved in 0.5 parts of physiological NaCl. After centrifugation the solution is divided in smaller portions to which equal parts of a 0.2 mol. phosphate buffer are added. This

rather high concentration of the buffer is used in order to obtain a good buffer capacity. The buffer capacity of the fibrinogen solution alone is only very slight.

*Measurement of the clotting time:* The clotting time for ox and horse fibrinogens is determined after our usual method (ASTRUP and DARLING (1941)). To 0.10 ml of the thrombin solution is added 1 ml of ice-cold fibrinogen solution. With human and chicken fibrinogens smaller quantities are used in smaller tubes: 5 drops of fibrinogen solution and respectively 1 or 5 drops of the thrombin solution. With human and chicken fibrinogens only solid gels are formed during the coagulation. With ox and horse fibrinogens the clotting time ( $t$ ) is determined as the moment when the first threads of fibrinogen are seen on shaking the solution. The measurements were carried out in a water bath at  $37^{\circ}\text{C}$ .

The results obtained with ox thrombin are shown in Fig. 1. The clotting time is measured in 0.01 min. and is the average value of three determinations. As the reciprocal of the clotting time gives an approximate measure for the action of the thrombin, these values are calculated. The potencies found in this way are shown in per cent of the maximal activity in Fig. 1.

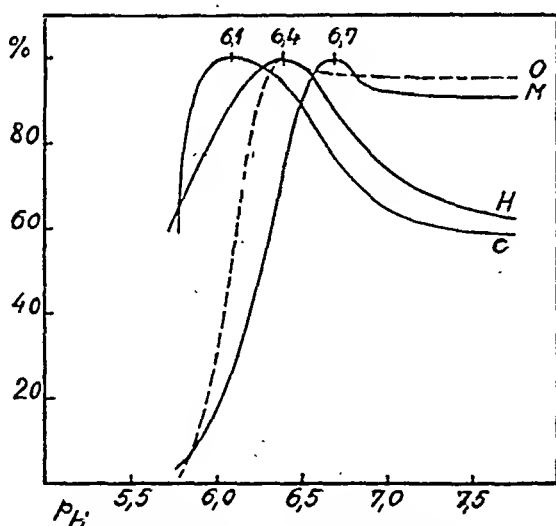


Fig. 1. Action of ox thrombin on different fibrinogens in relation to pH.  
O: Ox fibrinogen, M: Human fibr., H: Horse fibr., C: Chicken fibr.

From Fig. 1 it is seen that by using 0.2 mol. phosphate buffer the maximal action of ox thrombin on ox fibrinogen is obtained at pH 6.4. For horse fibrinogen the maximal activity is found at pH 6.4, for human fibrinogen at pH 6.7, and for chicken fibrinogen at pH 6.1.

Fig. 2 shows the results for the action of *chicken* thrombin on chicken fibrinogen. The potency is calculated as before and given in per cent of the maximal value. The results are presented together with a curve for the action of ox thrombin on chicken fibrinogen. It is seen that there is only a minor change in pH for

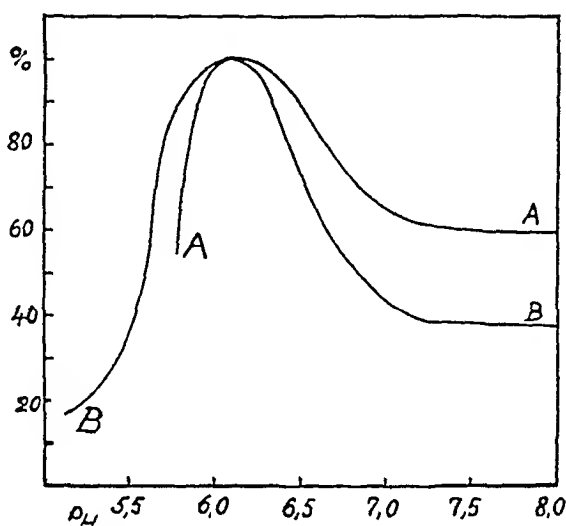


Fig. 2. Action of ox thrombin (Curve A) and chicken thrombin (Curve B) on chicken fibrinogen in relation to pH.

the maximal action, *i. e.*, from pH 6.1 for ox thrombin to 6.0 for chicken thrombin. This change falls within the limits of experimental error in these experiments. In principle, then, the action of chicken thrombin does not differ from that of ox thrombin on chicken fibrinogen. So the difference in the pH values for the maximal activities of ox thrombin presented in Fig. 1 cannot be due to the thrombin itself as a species-specific substance, but must be due to the different properties of the fibrinogens.

To make sure that the change in pH is not due to differences in the fibrinogen concentrations, new solutions containing different amounts of fibrinogen were prepared. The following three concentrations are used: 1.5, 1 and 0.5 of the usual solutions. The results are given in Table 1, where the clotting time is given in seconds. It is seen that the clotting time increases with decreasing concentration of fibrinogen. This relation is in accordance with investigations of WÖHLISCH, DIEBOLD and KIDERLEN (1936).

Table 1.

*Action of ox thrombin on ox fibrinogen of different concentration.*

(Clotting time in sec.)

pH	c = 1.5	c = 1.0	c = 0.5
7.7	16.9	17.2	26.5
7.3	15.6	15.8	24.8
7.0	14.5	15.8	21.8
6.7	10.7	10.9	17.6
6.4	6.4	8.2	16.6
6.1	7.9	14.0	> 60
5.8	> 60	> 60	—

The results show that only a negligible change in the pH is due to differences in the fibrinogen concentrations.

### Discussion of the Results.

The experiments show that there are great differences in the properties of the different fibrinogens tested against ox thrombin at different pH values when the experiments are carried out by using 0.2 mol. phosphate buffer. This relation must be taken into consideration when the action of thrombin on fibrinogen is investigated, if reliable results are to be obtained. It is seen, *f. inst.*, that if the action of a solution of ox thrombin on chicken fibrinogen at pH 6.1 is more rapid than the action of an other ox thrombin solution on ox fibrinogen, the contrary is the case at pH 6.4. With the other fibrinogens similar relations are found. In such investigations, then, comparable results cannot be obtained, if pH is not known, as the potencies of two thrombin solutions, used on different fibrinogens, may show different proportions at different pH values.

Thus, the different fibrinogens have different properties, manifest in their reactivity against ox thrombin at different pH values. The employment of a new thrombin species (chicken thrombin) seems not to alter these properties, and alteration of the fibrinogen concentration seems also to be of no importance.

Fibrinogens from different species, therefore, show species spe-

cificity. This specificity is not a complete lack of reactivity with a foreign protein (ox thrombin), but represents merely a difference in the degree of reactivity.

The results obtained are in accordance with experiences regarding the precipitation of the fibrinogen after the method of MEL-LANBY. As described in the experimental part, different pH values must be used for obtaining a good precipitate. Also by salt precipitation of fibrinogen, different results are obtained. It is well known that the method of HAMMARSTEN (precipitation by half saturation with sodium chloride) gives the best results for horse plasma and cannot be used for ox plasma. DAVIDE (1925) has investigated the precipitation of various plasmas with sodium chloride and found the following results: Guinea-pig and dog are precipitated between 30 and 40 per cent saturation; rabbit between 35 and 45 per cent; man between 40 and 50 per cent; horse between 45 and 60 per cent and sheep between 60 and 65 per cent. Also when sodium fluoride is employed, a higher saturation is required for preparation of ox fibrinogen than for horse fibrinogen (HUISKAMP (1905)). WÖHLISCH (1925, 1929) shows that the different properties are due to the fibrinogens and not to accompanying substances.

From their studies on the blood-coagulation, EAGLE (1935) and QUICK (1936) without any definite proof, however, arrived at the conclusion, that fibrinogen is not species-specific.

The problem of species specificity has been investigated also by using fibrinogen as an antigen and studying the precipitin reactions. In this way, however, the problem is difficult to solve, because it is practically impossible to prepare fibrinogen free from other proteins or denaturated products. This is seen, for instance, from the investigations reported by HEKTOEN and WELKER (1927). These authors have found that the fibrinogen precipitins produced are not species-specific in the usual sense, as in every instance there was an action on heterologous fibrinogens, and they mention some difficulties encountered in these immunological investigations. They are further of the opinion that rabbits can be immunized with rabbit fibrinogen, but this seems unlikely because the fibrinogen as a blood protein is circulating in the organism and hence is not comparable to an organ-specific protein, *e. g.*, eye lens protein, with which such immunisations can be carried out.

In a later paper (WELKER, GILMAN and HEKTOEN (1933)), the same experimental difficulties are mentioned again. In this paper

the authors have arrived at the conclusion, based on immunisation experiments, that fibrin is digested by pepsin in acid solution under formation of fibrinogen. However, the clotting ability of the resulting product with thrombin was not investigated. According to results from the blood-coagulation this conclusion seems highly improbable.

It may be added, that also the product resulting from the reaction of fibrinolysin on fibrin has been investigated in the same manner, and that the same difficulties in carrying out the precipitin reactions have been met with — as pointed out in particular by JABLONOWITZ (1937).

An investigation by DOWNS (1925) on the antigenic properties of »tissue fibrinogen» is mentioned by HEKTOEN and WELKER (1927) in their paper on the antigenic properties of fibrinogen. »Tissue fibrinogen» has nothing to do with the blood protein fibrinogen, however, but is an inaccurate term for the tissue factor (thrombokinase or thromboplastin), which is known already to show species specificity.

As mentioned already, the relation between thrombin and the pH value of the solutions has been the subject of many investigations. It has later been found, that the action of thrombin on fibrinogen besides being highly dependent on the pH value is also extremely dependent on the ionic strength of the solution, ASTRUP (1941). It is necessary, therefore, in such investigations to take alterations in the ionic strength into consideration, especially when buffers of varying ionic strength are employed. In this manner it has been possible to find concordance between the different statements on the pH relationship. These problems will be discussed in a subsequent paper.

For the question about the species specificity of the fibrinogen, the last mentioned relation is of no consequence, as the curves are obtained under identical conditions and therefore show differences in the properties of the fibrinogens irrespective of changes in ionic strength. The pH optima found are however not to be looked upon as absolute values, as they can be changed by changing the ionic strength.

It has also been found later, that MELLANBY fibrinogen, as used in these investigations, is often more impure than ammonium sulphate precipitated fibrinogen. The results obtained by investigation of such fibrinogen were however identical with the results here presented.

## Summary.

1. The action of thrombin on fibrinogen of various species in relation to pH is investigated.
2. Fibrinogen shows species specificity.

This work has been aided by grants from »Danmarks tekniske Højskoles Fond for teknisk Kemi» and from »Løvens kemiske Fabrik». Copenhagen.

## References.

- ASTRUP, T.: *Enzymologia*, 1938, 5, 119.  
ASTRUP, T.: *Nordisk Medicin*, 1941, 11, 2586.  
ASTRUP, T. and S. DARLING: *J. biol. Chem.* 1940, 133, 761.  
ASTRUP, T. and S. DARLING: *Acta Physiol. Scand.* 1941, 2, 22.  
DAVIDE, H.: *Acta Med. Scand.* 1925, Suppl. No. 13, 112.  
DOWNS, C. M.: *J. infect. Dis.*, 1925, 37, 49.  
EAGLE, H.: *J. gen. Physiol.* 1935, 18, 547.  
HEKTOEN, L. and W. H. WELKER: *J. infect. Dis.*, 1927, 40, 706.  
HUISKAMP, W.: *Hoppe-Seyl. Z.* 1905, 44, 182.  
JABLONOWITZ, J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.* 1937, 37, 548.  
QUICK, A. J.: *Amer. J. Physiol.* 1936, 115, 317.  
WELKER, W. H., G. GILMAN and L. HEKTOEN: *Ibidem* 1933, 106, 475.  
WÖHLISCH, E.: *Klin. Wschr.* 1925, 4, 1022.  
WÖHLISCH, E.: *Ergebn. Physiol.* 1929, 28, 549.  
WÖHLISCH, E., W. DIEBOLD und O. KIDERLEN: *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1936, 237, 599.



## Spectral Properties of the Visual Receptor Elements of the Guinea Pig.

By

RAGNAR GRANIT.

(Received 21 January 1942.)

---

The assumption that mammalian rod-eyes with a relatively small number of cones for this very reason may present the experimenter a simplified and hence analyzable picture of colour reception has already proved its value in the case of the albino rat studied with the microelectrode technique (GRANIT, 1941 a). In this animal I found after light-adaptation a narrow "red" sensitivity band with maximum in  $0.600 \mu$  coupled to a "green" one. The latter was a steep and narrow curve with the maximum of the absorption curve for visual purple. The light-adapted frog's eye, on the other hand, had several narrow "modulator" bands and in addition a broad "dominator" absorption band with maximum in  $0.560 \mu$  (GRANIT, 1942), that is, a band practically identical with the human photopic (day-light) luminosity curve. This region of the spectrum was empty in the rat's eye.

The same microelectrode technique has now been applied to the retina of the guinea pig which also has been found to lack a broad photopic "dominator" band and hence to be without a Purkinje shift in the strict sense of the term. But in selecting the guinea pig for the next analytical step I was fortunate in striking an animal with a remarkably prominent "blue" element. The results with this retina thus serve to justify the assumption underlying this experimental survey of the spectral properties of the receptive units in different retinae.

## Method.

The guinea pig is anaesthetized with 4—5 cc 20 % urethane intra-peritoneally, the skin cut away around the eye which then with a few stitches through the conjunctiva is tied to the surrounding tissue. When this has been done the cornea is cut away, the lens removed, and the animal placed under the binocular preparation microscope to be illuminated by its lamp at full strength (about 2,400 m. e.) if light-adaptation be wanted. This light was strong enough to depress the sensitivity of the eye to or below the threshold of the spectrum of my Tutton monochromator (model Hilger). Bleeding is much easier to avoid in this preparation than in the albino rat.

The microelectrode is inserted with the aid of a micromanipulator and a reactive spot found, characterized by large repetitive spikes upon illumination, and often also by spontaneous firing. The energy necessary for the absolute threshold or for a just perceptible increase of the spontaneous discharge has been determined by listening to the amplified spikes in a loudspeaker and simultaneously observing them on the screen of a cathode ray oscillograph. For this technique and the energy control of the spectrum the reader is referred to the paper by GRANIT and SVAETICHIN (1939). The whole eye is illuminated by the spectral light. As to sources of error with mammals, see author's paper on the rat's eye (1941 a).

## Results.

### Some General Observations.

In the guinea pig, as in the rat, it is relatively easy to obtain large isolated spikes of activity. Fig. 1a shows such a spike responding repetitively to light somewhat above the threshold for wave-length  $0.540 \mu$ ; fig. 1b shows a spontaneously active element responding with an increased frequency to stimulation with wave-length  $0.500 \mu$ . The variation in the size of the latter is probably due to a slight movement of the eye or the animal to judge by its gradual onset and disappearance. (The spike is an impulse discharged along the optic nerve, probably picked up near the ganglion cell, and not a b-wave (!), as has been contended. This term refers to an at least hundred times slower wave of the electroretinogram).

The spike is caused by the discharge of a single ganglion cell or else by some cells synchronized so well as to be inseparable. In this animal the typical discharge is a simple increase in frequency caused by illumination, an "on"-discharge. "On"- "off"-

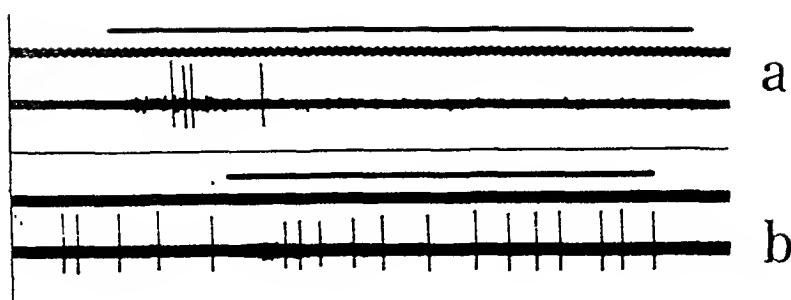


Fig. 1. a, discharge of isolated spike to stimulation with wave-length  $0.540 \mu$  slightly above threshold. b, spontaneously active spike responding with increase of frequency to stimulation with wave-length  $0.500 \mu$ . Light signal above each record and time in  $1/20$  sec.

discharges are not so common and pure "off"-discharges, so often seen in the frog's eye (cf. also HARTLINE, 1938), must be rare in this retina. These observations on the type of discharge have been made in passing, and are by no means systematical. Nevertheless the large number of receptors surveyed in work of this character gives a fairly good idea of the relative distribution of different types in different types of eyes.

#### Average Curves for Photopic and Scotopic Retinae.

By a series of observations is meant the averaged values for the spectral sensitivity (inverse value of energy necessary for the threshold) of a given active unit or group of units. Behind each series is thus a smaller or larger number of individual measurements, dependent upon how long the unit has kept up its discharge, or, if light-adapted, how long it has been possible to follow it before it has dark-adapted, as nearly all units sooner or later do (cf. GRANIT, 1941, a, b, 1942). As in other eyes, with both rods and cones, a slow recovery for all wave-lengths precedes dark-adaptation proper, characterized by a relatively sudden onset of a fast rise of sensitivity around  $0.500 \mu$ , the maximum of the absorption curve for visual purple. During the phase of slow recovery the photopic values have to be recorded.

In order to obtain curves for the average photopic and scotopic (dark-adapted) eyes it is possible to use (i) the electroretinogram which in itself is an average, or (ii) to average all series for either state of adaptation independently of the spectral distribution of sensitivity of the individual elements. I have here

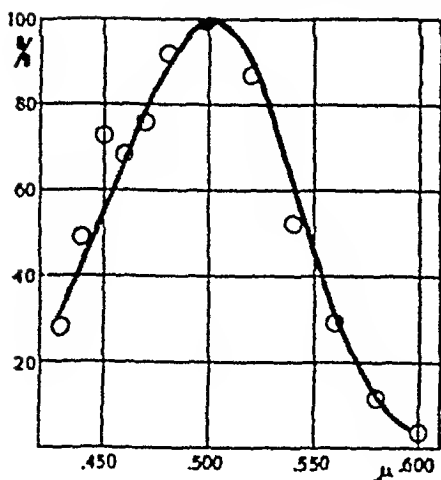


Fig. 2. Absorption curve for visual purple. The circles are averages from 20 series of measurements of spectral sensitivity of 16 scotopic guinea pigs. 137 averaged values. Spectrum of equal quantum intensity.

comprised 171, the photopic series 137 averages which now in their turn were averaged in order to show the mean spectral sensitivity of light- and dark-adapted animals.

The values obtained are shown in figs. 2 and 3, corrected for an equal quantum intensity spectrum. The scotopic curve drawn (fig. 2) is actually LYTHGOE's (1937) absorption curve for visual purple which gives a good fit. The large value in  $0.450 \mu$  comes from two series with a markedly blue-sensitive element despite dark-adaptation. The photopic curve is drawn through the averaged values and LYTHGOE's curve is indicated by the small black dots. There is a marked rise in the blue after light-adaptation but the maximum is still in the same place as in the scotopic eye.

used the latter method alone because of the little amount of potential available in the photopic eye. In averaging the series I have left out a number of casual observations in intermediate wave-lengths, as otherwise it would have been necessary to use the less reliable procedure of interpolating the corresponding values for the majority of the series in which only certain standard wave-lengths were used. For averaging were available 30 photopic series from 19 animals and 20 scotopic series from 16 animals. The photopic series

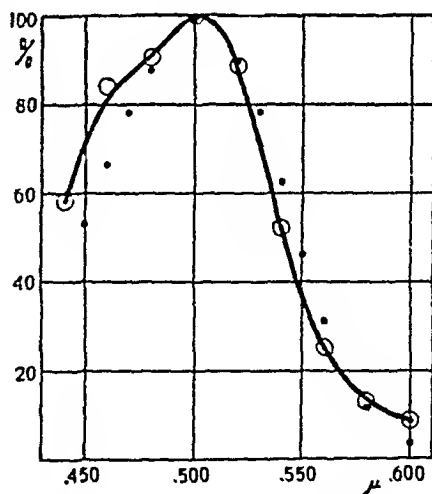


Fig. 3. Distribution of spectral sensitivity of the averages from 30 series obtained from 19 photopic animals. 171 averaged values. Black dots visual purple. Spectrum of equal quantum intensity.

### Analysis of the Average Curves.

In the dark-adapted retinae of the guinea pig the spectral sensitivity curves for single spikes are identical within the errors of measurement. There is practically no indication of a systematic difference from the average curve. Not so after light-adaptation. Just as in the frog's retina (GRANIT, 1942) there is in the guinea pig a definitely higher sensitivity to blue light in some elements, particularly in an intermediate stage of recovery from light-adaptation, somewhat before dark-adaptation sets in. If all elements with maximum in the blue are grouped together, and the readings averaged, the curve of fig. 4 is obtained. This

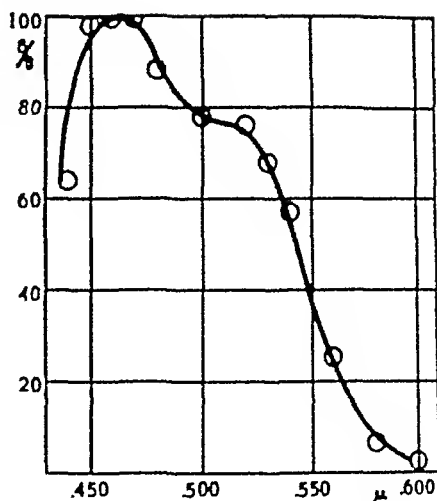


Fig. 4. Averages of all readings from photopic series with primary or secondary maximum in the blue, corrected for equal quantum intensity.

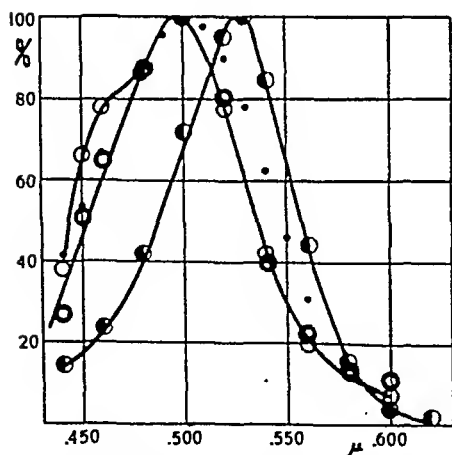


Fig. 5. To the right: Averages of all readings from photopic series with maximum around 0.530  $\mu$ . To the left: Do with maximum around 0.500  $\mu$ , falling into two groups either possessing or lacking hump in the blue. Black dots visual purple. All corrected for an equal quantum intensity of the spectrum.

curve has a secondary hump in the green. Only once I have seen a single element with maximum in 0.450  $\mu$  and as low as 40 % sensitivity in 0.500  $\mu$ .

However, the most common elements have their maximum in 0.500  $\mu$ . Of these there are two kinds: the one possessing, the other one lacking a hump in the blue. These are shown to the left in fig. 5. The two curves do not differ significantly in the red. When the hump is lacking it can be seen that the curve falls inside LYTHGOE's absorption curve for visual purple and thus represents an abnormally steep and

narrow visual purple distribution. The same type of element was found in the rat's eye (GRANIT, 1941 a).

Relatively rare is the element to the right in fig. 5 with maximum in  $0.530 \mu$ . I should have doubted its presence had it not been possible in one of these experiments to make 53 observations with a spike lacking spontaneous activity. Initial

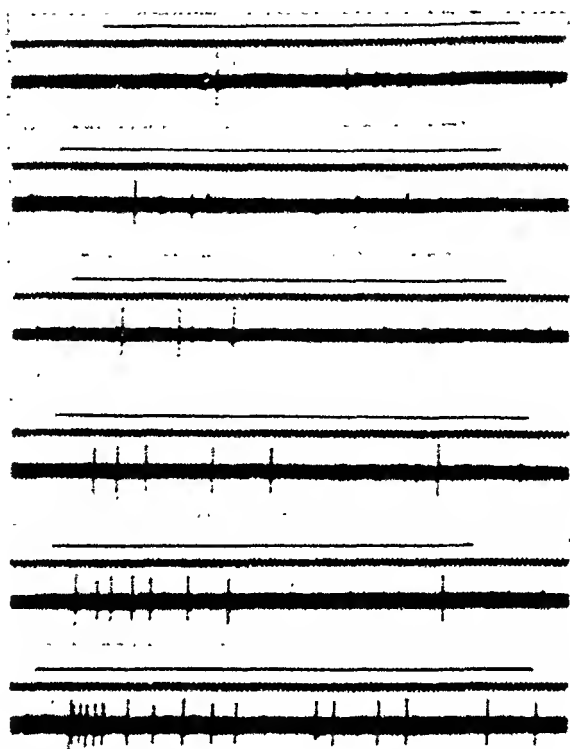


Fig. 6. Isolated unit with maximum in  $0.530 \mu$  responding to different intensities, increasing from record to record downwards. The uppermost value near threshold at relative sensitivity ( $1/E$ ): 16.0. The other inverse values of the energies used for eliciting these responses are (downwards) 14.2, 10.8, 7.2, 4.1 and 1.5.

silence under the electrode greatly enhances the accuracy of the experiment. In fig. 6 is given a number of photographs of the response of this particular unit together with the inverse values of energy necessary for eliciting the responses illustrated. In fig. 7 is found the spectral distribution of sensitivity of this unit. Elements of this type, narrow bands with maxima around  $0.530-0.540 \mu$ , have also been found in the frog's eye (GRANIT, 1942).

The dominant impression from the actual experimental situation is that invariably there is low sensitivity towards the red, the curves in this region falling inside the absorption curve for visual purple, but unpredictable great variations in the blue from case to case, and that the maxima in general are gathered around  $0.500 \mu$ . This impression is based also on a great number of less systematic experiments than the ones leading to more or less complete series.

Nevertheless I am not absolutely certain that a "red" element can be wholly excluded. There are some rare cases in which the values around  $0.600 \mu$  have tended to be at or just above 10 % of the maximum which is a little too much even for visual purple (about 3 %).

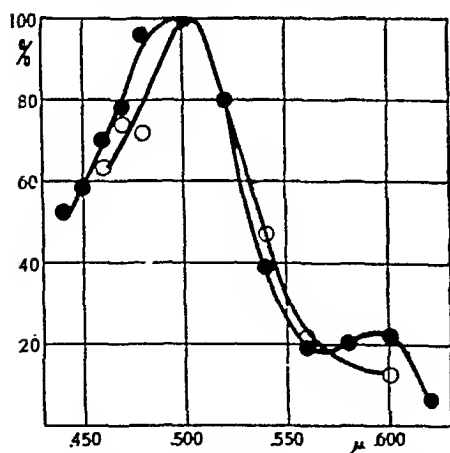


Fig. 8. Spectral distribution of sensitivity of a group of spikes with indication of secondary rise in  $0.600 \mu$ . Open circles refer to readings taken 1–20 min. after cessation of light-adaptation, filled circles same from 20–50 min. afterwards. Equal energy spectrum.

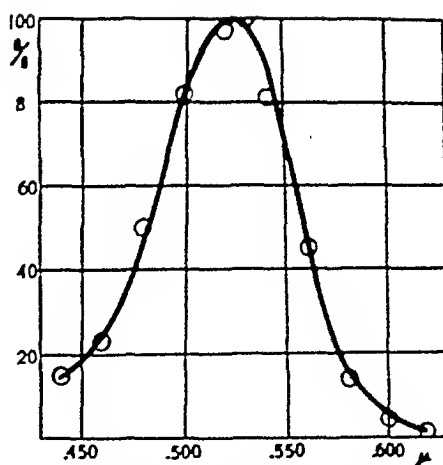


Fig. 7. The spectral distribution of sensitivity of the active unit of fig. 6. 53 averaged values corrected for equal quantum intensity.

by intraretinal vessels or bleeding in the eye could perhaps explain these cases (cf. GRANIT, 1941 a). One such case is shown in fig. 8. The rat's eye has a well defined maximum in this region (GRANIT, 1941 a). But in its eye the "red" receptor quite often is the only one left immediately after light-adaptation whereas in the eye of the guinea pig wavelength  $0.600 \mu$  generally is below the threshold of the monochromator until some recovery from light-adaptation has taken place.

### Conclusion.

In animals with good colour vision such as fishes, the tortoise and the frog (GRANIT, 1941, a, b, 1942) there has always been found a broad "dominator" photopic band carrying the Purkinje shift. But in the rat, and now in this animal, all the sensitivity bands have been of the narrow "modulator" type. These are also found in animals with good colour vision from which I have concluded that they must serve to modulate the spectral distribution of the dominator. The latter must be mainly responsible for photopic white (brightness). Brightness, after all, is the fundamental sensation of the eye. So far I have seen a dominator band in only one of the three mammals hitherto examined, i. e. in the cat (GRANIT, 1942 unpublished).

The guinea pig thus has three narrow modulators, one no doubt identical with the narrow band in the rat's eye representing some simple modification of visual purple. The "green" modulator with maximum in  $0.530 \mu$  and the "blue" band are probably identical with corresponding bands in the frog's eye.

The experiments have shown that the "blue" and the visual purple green ( $0.500 \mu$ ) are difficult to isolate in the photopic eye of the guinea pig. This may be simply a matter of convergence of receptors of different type towards the same ganglion cell from which recording takes place. Other physiological consequences of convergence have recently been analyzed by HARTLINE (1940) in the frog's optic nerve. But for some reason or other the "blue" band was easier to separate from visual purple in the frog's eye where it also was of the narrow modulator type with maximum between  $0.450-0.470 \mu$ . As a first approximation I shall therefore assume that the "blue" band of the guinea pig's retina is of a similar kind and of a width intermediate between the two "green" bands of this eye. Its maximum should perhaps be placed nearer to  $0.450 \mu$  on account of the fact that it never goes to the right of  $0.460 \mu$ , despite an additional green component tending to expand it in this direction.

### Synthesis of the Average Photopic Curve.

The three elements found must combine to give the average photopic curve of fig. 3 for this animal. The form and position of two of the elementary curves will be taken to be given directly



by the experiments, whereas the third, the "blue" one, is drawn in accordance with the principles set forth above. The question is now in what proportion these elementary modulator curves should be combined to give the average curve for the light-adapted guinea pig's eye.

This problem may, of course, be solved by a method of trial and error, but since I actually solved it with the aid of a simple assumption this assumption may just as well be mentioned in this paper. Having no particular reason to hold one of the elements to be more sensitive to light inside its own range than another I took them to be of equal sensitivity and assumed

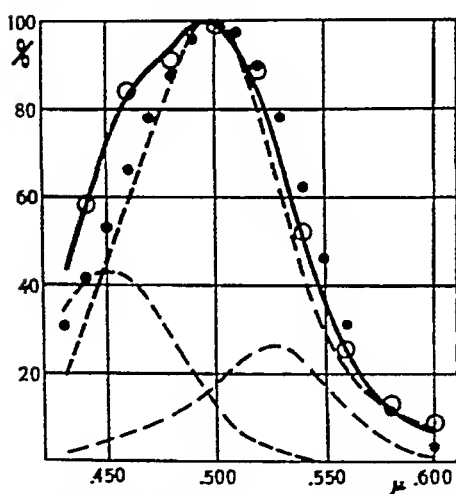


Fig. 9. Curves in broken lines represent the three elementary narrow "modulator" bands in a proportion adding up to curve drawn in full. The circles are from fig. 3 and thus refer to averages of all light-adapted guinea pigs. Black dots visual purple. See text. Spectrum of equal quantum intensity.

the height of the individual curves to be proportional to the number of elements of this particular type. An approximative value for the relative number of each colour element could be obtained experimentally from the number of incidence of each type of maximum in the 30 photopic series. Let the incidence of the most common element with maximum around 0.500  $\mu$  be 100; then the "blue" element has occurred 42.8 times and the 0.530-element 26.4 times. The curves shown by the broken lines of fig. 9 illustrate the three elementary modulators in this proportion.

These modulator bands combine to the curve drawn in full which, as the figure shows, gave a good fit with the values from fig. 3. I have then neglected the possibility of a very rare "red" modulator which would be so low as to be of little significance. The modulators would permit some discrimination in the green, blue and violet regions of the spectrum and the brightness perception (luminosity curve) would in both states of adaptation roughly reproduce the absorption curve for visual purple, corrected for losses in the cornea which here has been removed.

Whether the animal utilizes this mechanism of colour discrimination, laid down in the retina, is of less interest from the present point of view. I have not found any reliable experiments designed to answer this question.

### Is the "Blue" Substance Lactoflavin?

Lactoflavin was first found in the retina by H. v. EULER and his collaborators (v. EULER and ADLER, 1933). Elsewhere I have reviewed the literature on this subject (GRANT, 1938). Eyes of fishes are particularly rich in lactoflavin but it is chiefly, if not exclusively, found in the pigment layer. As it absorbs maximally around  $0.450 \mu$  in the visible spectrum it *could* be the "blue" substance of the eyes of guinea pigs and frogs, or else it may serve to extend the blue side of the spectrum by fluorescence, as has also been suggested by v. EULER and ADLER.

Since sensitivity to blue is well marked in the guinea pig and low in the albino rat (GRANT, 1941 a) it seemed worth while to compare the lactoflavin content of these two types of mammalian eyes. Prof. H. v. EULER and Dr ADLER kindly undertook to make these measurements. I am greatly indebted to them for this generous aid and for permission to publish their figures.

Their method has been described elsewhere (ADLER, v. EULER, GUENTHER and PLASS, 1939). The experimental material consisted of 100 retinæ of albino rats and 68 retinæ of guinea pigs. The rat's retina was found to contain 0.005—0.01, the guinea pig's retina 0.01—0.015  $\gamma$  of lactoflavin. The quantities found are thus very small and the difference, though in the right direction, does not either suggest that the reception of blue in the guinea pig is mediated by lactoflavin.

The only alternative explanation, at present worth considering, is the possibility that the "blue" substance is a photoproduct of bleached visual purple, discovered by LYTHGOE (1937) and called by him "transient orange". LYTHGOE and QUILLIAM (1938) have preliminarily placed its maximum in  $0.470 \mu$  but at least one of their curves indicates a maximum in  $0.460 \mu$ .

### Summary.

Microelectrode, amplifier and cathode ray have been used for the recording of "spikes" of activity from isolated elements of

the retina of the guinea pig in response to monochromatic light of known energy distribution.

The average distribution of sensitivity to spectral light of photopic (light-adapted) and scotopic (dark-adapted) eyes suggests that visual purple is the main substance mediating sensations in this eye. These curves are given in figs. 2 and 3.

Individual units of scotopic retinæ follow the absorption curve for visual purple very closely.

In the photopic state most units are activated by a narrow sensitivity band with the maximum of visual purple; some units respond to a narrow band with maximum in  $0.530 \mu$ . But there are also elements with maximum in the blue region around  $0.460 \mu$ . As a rule these units cannot be isolated from those with maximum in  $0.500 \mu$ .

But assuming the "blue" elements to represent narrow bands of the type given by the "green" ones (maxima in  $0.500$  and  $0.530 \mu$ ) the average photopic curve, which possesses a hump in the blue region of the spectrum, can be combined by adding up the three elementary curves in the right proportion. Thus it has become possible to give a complete description of the spectral properties of the photopic elements in the guinea pig's eye.

Isolated elements are easily obtained in this eye and their reaction types have been described.

The possible relation of the "blue" substance to lactoflavin and "transient orange" has been discussed. Of all retinæ hitherto studied this one has the most prominent sensitivity to blue light.

The author is indebted to the Rockefeller Foundation for a grant to this laboratory.

#### References.

- ADLER, E., H. v. EULER, G. GUENTHER and M. PLASS: *Skand. Arch. Physiol.* 1939. 82. 61.  
 v. EULER, H. and E. ADLER: *Sv. Kem. Tidskr.* 1933. 45. 276.  
 GRANIT, R.: *Documenta Ophthalm.* 1938. 1. 7.  
 —, *Acta physiol. Scand.* 1941 a. 2. 93.  
 —, *Ibidem.* 1941 b. 2. 334.  
 —, *Ibidem.* 1942. 3. 137.  
 HARTLINE, H. K.: *Amer. J. Physiol.* 1938. 121. 400.  
 —, *Ibidem.* 1940. 130. 690, 700.  
 LYTGOE, R. J.: *J. Physiol.* 1937. 89. 331.  
 — and J. P. QUILLIAN: *Ibidem.* 1938. 94. 399.

## Eine Farbenreaktion mit Isobutyraldehyd zur kolorimetrischen Bestimmung von Valin.

Von

K. A. J. WRETTLIND.

(Eingegangen am 27. Januar 1942.)

---

Bei Aminosäureanalysen an Proteinhydrolysaten hat die Bestimmung von Leucin und Valin noch nicht die wünschenswerte

Vollendung erreicht. Nach FROMAGEOT und HETZ (1939) werden die beiden Aminosäuren mit  $\text{HNO}_2$  in ihre Oxy Säuren übergeführt und diese mit Chromsäure zu Aceton oxydiert, das kolorimetrisch bestimmt wird. Da es leichter ist,  $\alpha$ -Oxyisovaleriansäure (aus Valin) als  $\alpha$ -Oxyisocaproensäure (aus Leucin) in Aceton überzuführen, gibt es eine Möglichkeit, die beiden Säuren in Gemischen zu bestimmen. Die Methode scheint etwas umständlich und unsicher zu sein. Auch hat STAKHEEVA-KAVERZNEVA (1940) beim Nachprüfen die Methode als falsch befunden.

LAINÉ (1938) und VIRTANEN, LAINÉ und TOIVONEN (1940) behandeln Leucin und Valin mit Ninhydrin und bestimmen die Aldehyde titrimetrisch mit Bisulfit nach Destillieren mit Wasserdampf. Diese Methoden können bei Aminosäuregemischen nicht verwendet werden.

Weil es sehr leicht ist, diese beiden Aminosäuren quantitativ in die Aldehyde, Isobutyraldehyd und Isovaleraldehyd, überzuführen, entweder mit Hypochlorit nach LANGHELD (1909) oder mit Ninhydrin nach der Methode von VIRTANEN, LAINÉ und TOIVONEN (1940), hat der Verfasser die Möglichkeit untersucht, diese Aldehyde quantitativ kolorimetrisch zu bestimmen.

Nach einigem Suchen wurde eine rote Farbenreaktion mit alkalischer Salicylaldehydlösung und den beiden erwähnten Aldehyden

gefunden, die der FABINYIS'schen Reaktion (1900) mit demselben Reagenz auf Aceton ähnlich ist. Mit Isobutyraldehyd ist die Reaktion sehr intensiv und bis zur 5  $\gamma$  pro ml erkennbar, während die Reaktion mit Isovaleraldehyd etwa 100 mal schwächer ausfällt. Mit der im Nachstehenden genau angegebenen Reaktion scheint es möglich zu sein, Valin zu bestimmen, entweder allein oder im Gemisch mit Leucin.

Aceton stört die Reaktion, da es ja mit Salicylaldehyd eine ähnliche Farbe gibt. Dagegen geben Acetaldehyd, Aethylacetat, Aether, Aethylalkohol, Amylacetat, Benzol, Formaldehyd, Isobutylalkohol, Methylalkohol, Isobuttersäure und Isovaleriansäure diese Farbenreaktion nicht.

### Quantitative kolorimetrische Bestimmung von Isobutyraldehyd.

*Prinzip.* In einer alkalischen Lösung von Salicylaldehyd gibt Isobutyraldehyd eine intensive Rotfärbung.

*Reagenzien.* 1. 10.5 N NaOH.

2. 20volumenprozentiger Salicylaldehyd.

20 ml. Salicylaldehyd, ad 100 ml. mit 95 %-igem Aethylalkohol versetzt.

3. Standardlösung von Isobutyraldehyd:

0.1 ml Isobutyraldehyd (20° C) wird in 10 ml 95 %-igem Aethylalkohol gelöst und dann vorsichtig Wasser bis auf 1,000 ml hinzugegeben. Hierbei ergeben sich 79.38  $\gamma$  Isobutyraldehyd pro ml.

*Verfahren.* Von einer Lösung, die 4—50  $\gamma$  pro ml Isobutyraldehyd enthält, werden 3 ml im Reagenzgläschen (200  $\times$  20 mm.) mit 2 ml genau 10.5 N NaOH und 1 ml 20-volumenprozentigem Salicylaldehyd versetzt. Hierbei erhält man sofort die gelbe Farbe, die durch Salicylaldehyd und Natriumhydroxyd hervorgerufen wird. Ferner werden Kontrollen mit 3 ml Wasser, 2 ml 10.5 N NaOH und 1 ml 20-volumenprozentigem Salicylaldehyd gemacht. Die Gläschen werden in ein Wasserbad von 50° C gesetzt und sollen daselbst 70 Minuten stehen bleiben. Nachdem man sie 10 Minuten mit fließendem Wasser gekühlt hat, kolorimetriert man die rote Farbe in einem Zeiss-Photometer mit Farbenfilter S<sub>50</sub> und Küvetten von 1 cm für 2—30  $\gamma$  Isobutyraldehyd pro ml. und 1/2 für 30—60  $\gamma$  pro ml. Als Kompensationslösungen werden die Kontrollen verwendet.

Die Menge Isobutyraldehyd in 3 ml wird nach folgender Formel berechnet:

$$\gamma \text{ Isobutyraldehyd} = 66.5 \times E_{50}^1$$

$E_{50}^1 \left( -\log \frac{I_{\text{post}}}{I_{\text{ante}}} \right) = \text{Extinktion mit Farbfilter } S_{50} \text{ und eine Schichtdicke von 1 cm.}$

### Diskussion und Kontrolluntersuchungen.

Die Konzentration an Natriumhydroxid darf nicht zu gross sein, da man sonst ohne Anwesenheit von Isobutyraldehyd rote Färbung erhält. Diese Verfärbung bleibt aus, wenn NaOH von nicht grösserer Stärke als etwa 10.5 N verwendet wird. In der oben beschriebenen Methode ist ein grosser Überschuss an Salicylaldehyd, 250 mg pro Bestimmung, notwendig. Es kann angenommen werden, dass maximal nicht mehr als etwa 250  $\gamma$  pro 100  $\gamma$  Isobutyraldehyd in Frage kommen.

Als Temperatur des Wasserbades wurde 50° C gewählt, um das Verdampfen von Isobutyraldehyd zu verhindern. Der Zusammenhang zwischen Zeit und Farbenintensität wird durch die Kurve in Abb. 1 demonstriert.

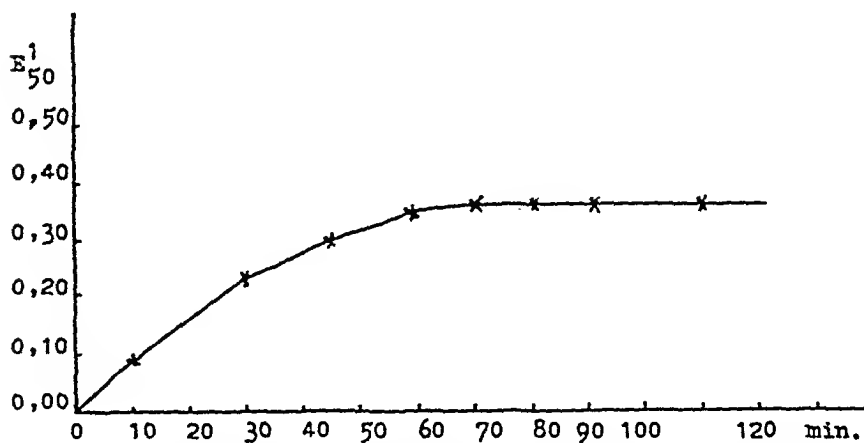


Abb. 1. Die Abszisse zeigt die Zeit der Erwärmung bei 50° C an. Nach dem Kühlen im fliessenden Wasser wird die Extinktion bestimmt. Ordinate: Gefundene Extinktion bei Farbfilter  $S_{50}$  und 1 cm Schichtdicke. Es wurde eine Lösung mit 7.94  $\gamma$  Isobutyraldehyd pro ml verwendet.

<sup>1</sup> Mit Isobutyraldehyd »Kahlbaum« bestimmt.

Aus Abb. I ersieht man, dass eine Erwärmung von über 70 Minuten Dauer im Bade von 50° C keine weitere Intensifizierung der Farbe gibt.

Dass die Extinktion  $\left(-\log \frac{I_{\text{post}}}{I_{\text{ante}}}\right)$  der Menge des Isobutyraldehyds proportional ist, zeigt Tabelle 1. Darum gilt die Formel nach LAMBERT-BEER.

Tabelle I.

Isobutyraldehyd γ/3 ml.	$E_{50}^1$	$k = \frac{c}{E}$	Abweichung vom Mittelwert in Prozent
11.9	0.180	66.0	1
15.9	0.240	66.2	0.5
23.8	0.865	65.2	2
47.6	0.720	66.0	1
77.6	1.14	68.0	2
<sup>1</sup> 155.2	2.30	67.5	1.5

Mittelwert: 66.5.

Aus Tabelle 1 erhält man also:  $\gamma$  Isobutyraldehyd =  $66.5 \times E_{50}^1$ .

## Identifikation und Nachweis von Valin.

*Prinzip.* Valin wird mit Ninhydrin nach einer Modifikation der Methode von VIRTANEN, LAINE und TOIVONEN in Isobutyraldehyd übergeführt. Der Isobutyraldehyd wird danach mit Wasserdampf überdestilliert und nach der oben beschriebenen Methode bestimmt.

Bei der hier beschriebenen Methode werden nur die Aldehyde, die aus Alanin, Valin, Norvalin, Leucin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin und Asparaginsäure entstehen, überdestilliert.

Alanin und Asparaginsäure stören die Reaktion nicht. Leucin, Isoleucin, Methionin und Phenylalanin geben eine Rotfärbung, die etwa 100-mal so schwach ist wie diejenige von Valin. Die Einwirkung von Norvalin und Norleucin ist noch nicht untersucht.

Folgende Aminosäuren, Arginin, Glutaminsäure, Glycin, Prolin, Oxyprolin, Tryptophan und Tyrosin geben keine überdestillierbaren Aldehyde und haben keine Einwirkung auf die Farbenreaktion.

<sup>1</sup> 1/2 cm Schichtdicke.

Die Oxydation mit NaOCl nach LANGHELD ist zu vermeiden, weil das Oxydationsprodukt von  $\alpha$ -Oxyprolin eine ähnliche und sehr intensive Rotfärbung mit Salicylaldehyd gibt.

*Reagenzien.* 1. Ninhydrin. 2.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pro analysi. 3. NaCl, pro analysi. 4. Die Reagenzien, die zur schon beschriebenen quantitativen Bestimmung des Isobutyraldehyds nötig sind.

*Verfahren.* Zur Bestimmung des Valins wird der in Abb. 2 gezeichnete Apparat benutzt.

Den Reaktionsgefäß B beschickt man mit 100 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 150 mg NaCl und Ninhydrin, etwa die 6-fache Menge der Aminosäuren. 1 ml einer Valinlösung, die 20—250  $\gamma$  Valin pro ml enthält, wird dazu gesetzt, Hahn D muss da geschlossen sein. Das

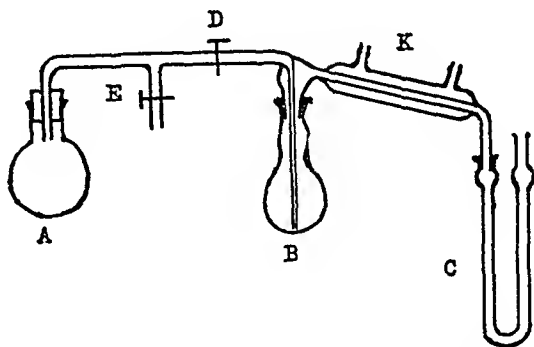


Abb. 2. A ist ein 50 ml. Kolben, der als Wasserdampfgenerator verwendet wird. B (20 ml.) wird als Reaktionsgefäß gebraucht. Den Kolben B erwärmt man im Metallbad. Das U-Rohr C von 10 ml. ist genau graduert und wird vom Eiswasser umgeben. K = Kühler, E und D sind Hähne.

U-Rohr wird vorher mit 0.5—1.0 ml aq. dest. gefüllt und mit Eiswasser umgeben. 5 Min. erhitzt man so den Kolben B bis auf 120° C, und danach wird ein schwacher Wasserdampfstrom nach dem Schliessen von E und Öffnen von D durchgeleitet. Das Destillieren soll etwa 10—15 Min. dauern, wobei 6—8 ml Wasser sich in der Vorlage angesammelt hat. Die Menge wird genau abgelesen. Davon nimmt man 3 ml zur Analyse auf Isobutyraldehyd.

*Berechnungen:* Die Reinheit der aus Valin entstehenden Farbe wird kontrolliert. Die Extinktion wird in  $S_{50}$  und  $S_{53}$  bestimmt.

Valin (oder Isobutyraldehyd) gibt da den Quotienten  $\frac{E_{50}}{E_{53}} 1.7$ .

Wenn die Ausbeute 100 % ist, erhält man die Menge Valin nach der folgenden Formel:

$$\text{Valin} = \frac{a}{3} \times 108 \times E_{50}^1$$

$a$  = ml Lösung im U-Rohr nach dem Destillieren.

Doch muss gesagt werden, dass die Ausbeute nicht immer so gut ist, sondern zwischen 70—100 % liegt.



### Zusammenfassung.

Eine Farbenreaktion mit Salicylaldehyd auf Isobutyraldehyd wird beschrieben und eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Isobutyraldehyds ist ausgearbeitet worden. Dieselbe Farbenreaktion wird zum Nachweis von Valin verwendet und zur quantitativen Bestimmung des Valins vorgeschlagen.

Diese Untersuchung ist mit Mitteln aus der Stiftung »Therese och Johan Anderssons minne» ausgeführt. Herrn Doktor E. Jorpes danke ich für wertvolle Hilfe und Ratschläge.

### Literatur.

- FABINYI, R. Chem. Zbl., 1900, *II*: 302.  
FROMEGEOT, C., und P. HERTZ, Enzymologia, 1939, *6*: 258.  
LAINE, T. Suomen Kemistilehti, 1938, *II b*: 28.  
LANGHELD, K. Ber. dtsh. Chem. Ges. 1909, 2360.  
STAKHEEVA KAVERZNEVA, E. D. Biokimiya, 1940, *4*: 513.  
VIRTANEN, A. T., T. LAINE und T. TOIVONEN, Hoppe Seyl. Z., 1940, *266*: 193.
-

# The Influence of Sympathicolytica on the Action of Adrenaline Substitutes on Isolated Intestine.

## I. Bee Venom and Ergotamine.

By

BÖRJE EMILSSON.

(Received 2 February 1942.)

In spite of the fact that the action of adrenaline-like drugs on isolated intestine has been the subject of very extensive research, there are hitherto only scattered reports in the literature, as to the influence of sympathicolytic drugs on the action of adrenaline substitutes on isolated intestine. The present author undertook a systematical investigation of this problem. In this paper bee venom and ergotamine will be considered.

## Methods.

The experiments were performed on isolated surviving rabbit's small intestine according to the Magnus technique. The animals were killed by a blow on the occiput followed by bleeding from the carotid artery. The intestinal segments were suspended in Tyrode solution at a temp. of 38° C. Through the solution, which consisted of NaCl 0.8 %, KCl 0.02 %,  $\text{CaCl}_2$  0.01 %,  $\text{MgCl}_2$  0.01 %,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.005 % and  $\text{NaHCO}_3$  0.1 %, was bubbled a mixture of 95 %  $\text{O}_2$  and 5 %  $\text{CO}_2$ .

The following drugs were used: Apicur Roche (Hoffmann la Roche), Forapin (H. Mack Nachf.), Apidac Om (Laboratoires Om), ergotamine tartrate (Sandoz), l-adrenaline hydrochloride, l-corbasil hydrochloride, d-corbasil base, dl-arterenol hydrochloride, dl-adrenalone hydrochloride, d-, l- and dl-ephedrine hydrochloride, dl-suprifen hydrochloride (Bayer),

l-adrianol hydrochloride, d-adrianol tartrate, l- and d-sympatol hydrochloride (Boehringer), dl-benzedrine sulphate (Medicinalco) and dl-veritol sulphate (Knoll)<sup>1</sup>. In the experiments with bee venom Apicur Roche was used in most cases. The concentrations of the adrenaline-like drugs are calculated as  $\gamma$ /ml free base.

### Bee Venom.

SJÖVALL (1939) was the first to show that the inhibiting action of adrenaline on isolated rabbit's intestine is diminished or abolished by previous addition of bee venom. According to him bee venom stimulates the intestine in weak or moderate doses (increase of tone or amplitude); in large doses it often has a depressant action (decrease of tone or amplitude). The inhibiting action of adrenaline (0.03—0.07  $\gamma$ /ml) is completely abolished by previous addition of bee venom in conc. 10—17  $\gamma$ /ml. The author concludes that bee venom stimulates the smooth muscle and at the same time paralyzes the autonomic innervation.

BERGENHEM and RYDIN (not published) confirm that bee venom decreases or abolishes the inhibiting action of adrenaline on isolated rabbit's intestine.

#### *Own investigations:*

a) Effect of bee venom: As shown by RICHTER (1938) the action of bee venom on isolated guinea pig's intestine is characterized by immediately developing tachyphylaxis. This holds true also for isolated rabbit's small intestine, which seems to have been overlooked by SJÖVALL (loc. cit.). The first dose of bee venom (conc. 0.02—20  $\gamma$ /ml) may give an effect of two different types, either very strong increase of tone accompanied by decrease of amplitude or a moderate increase of tone as well as of amplitude. If the effect is of the first type the increase of tone and decrease of amplitude seem to be directly proportional to the conc. of bee venom; in the second case there is no constant relation between the strength of the motor effect and the bee venom dose. The effect of following doses of bee venom almost always is of the second type; only if the first dose is very low and the second high, the effect may come nearer to the first type.

b) Bee venom and adrenaline: Bee venom in conc. 0.04—0.15  $\gamma$ /ml decreases the inhibiting action of l-adrena-

<sup>1</sup> I am most indebted to Hoffmann la Roche A. G., Basel, I. G. Farbenindustrie A. G., Leverkusen a. Rh. and C. H. Boehringer Sohn, Ingelheim a. Rh. for a supply of the investigated drugs.

line (0.06—0.14  $\gamma$ /ml) on isolated rabbit's intestine; in some cases the inhibitory effect is completely abolished. If the conc. of bee venom is raised to 0.5  $\gamma$ /ml or higher, the inhibiting action of adrenaline almost always is completely abolished, but if the bee venom has increased the tone of the intestine very much, adrenaline in most cases causes a fall of tone to the original position.

It may be concluded that bee venom stimulates the smooth muscle and at the same time blocks the sympathetic receptors, i. e. has a sympathicolytic action. The blockade of the receptors develops within a few minutes after the introduction of bee venom.

After 3—4 washings with fresh Tyrode solution the inhibiting action of adrenaline appears again with full strength. In many cases — especially if the conc. of bee venom was high — the primary inhibiting action is followed by a secondary stimulation (increase of tone or amplitude or both) of the intestine.

### Ergotamine.

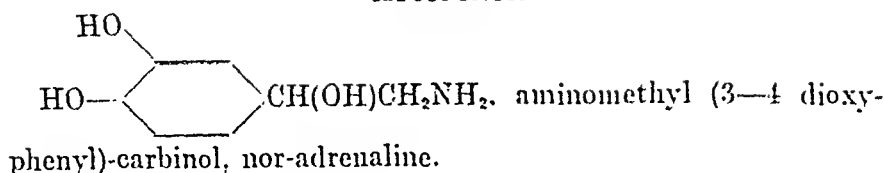
That previous addition of ergotamine can abolish the inhibiting action of adrenaline on isolated intestine was shown by ROTHLIN (1925), and PLANELLES (1925). MENDEZ (1928) was not able to confirm the results of the previous investigators and concludes that ergotamine in conc. sufficient to abolish almost completely augmentor responses to fairly large conc. of adrenaline, does not alter various inhibitor responses to adrenaline.

ROTHLIN (1929) made a very extensive investigation of the problem. He finds, that the typical adrenaline effect on isolated rabbit's small intestine is neutralized, after 5—10 minutes, with or without washing, by an amount of ergotamine 1.5—2 times as large as that of adrenaline. The ergotamine-action disappears in about an hour, whereupon the sensitiveness to adrenaline becomes again normal. As a rule ergotamine in conc. which annul the adrenaline effect has no direct action on the intestine. NANDA (1931) confirmed the findings of ROTHLIN at principal points but showed that the antagonism between ergotamine and adrenaline is much less obvious with the isolated rabbit's duodenum than the ileum and that ergotamine has much less power to antagonize the fall in tone produced by adrenaline than the inhibiting action on the pendulum movements.

#### *Own investigations:*

My results from the experiments with adrenaline and ergotamine on isolated rabbit's small intestine are in full agreement with the reports of ROTHLIN and NANDA (loc. cit.).

## Arterenol.



GREER, PINKSTON, BAXTER and BRANSON (1938) report that dl-arterenol inhibits the isolated rabbit's duodenum and that it is several times less effective than l-adrenaline in doing so. AUMANN and YOUNG (1939) find the inhibiting activity of l-adrenaline to be 1.5—2 as great as that of dl-arterenol.

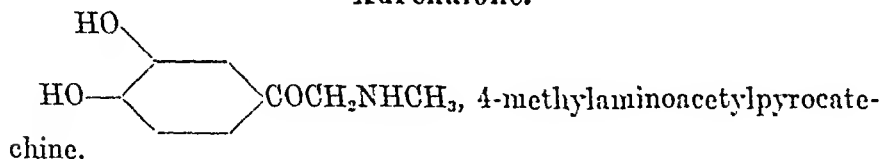
*Own investigations:*

a) Effect of dl-arterenol: dl-Arterenol inhibits the isolated rabbit's intestine in conc. higher than 0.05  $\gamma$ /ml. The effect is qualitatively quite similar to that of adrenaline; the inhibiting activity of dl-arterenol is about  $1/2$  of that of l-adrenaline.

b) Bee venom and arterenol: The inhibiting action of dl-arterenol (0.1—0.3  $\gamma$ /ml) is completely abolished by bee venom in conc. 0.5—20  $\gamma$ /ml. The effect is completely reversible and the repeated reproduction is quite feasible.

c) Ergotamine and arterenol: Ergotamine in conc. 0.3—0.5  $\gamma$ /ml (time of action 10—15 min) abolishes completely and reversibly the inhibiting action of dl-arterenol (0.1—0.3  $\gamma$ /ml).

## Adrenalone.



AUMANN and YOUNG (1939) find the inhibiting activity of dl-adrenalone on isolated rabbit's intestine to be  $1/20$ — $1/50$  of l-adrenaline.

*Own investigations:*

a) Effect of dl-adrenalone: The isolated rabbit's intestine is inhibited by dl-adrenalone in conc. higher than 0.3  $\gamma$ /ml. The inhibiting activity of dl-adrenalone is  $1/25$ — $1/50$  of l-adrenaline; the effects are qualitatively quite similar.

b) Bee venom and adrenalone: Bee venom in conc. 0.5—10  $\gamma$ /ml greatly diminishes or completely abolishes the inhibiting action of dl-adrenalone (0.5—3  $\gamma$ /ml). (See Fig. 1.) The effect is quite reversible and may be reproduced again and again.

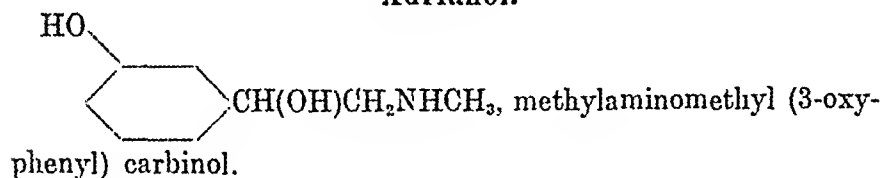


Figure 1. Isolated rabbit's small intestine in Tyrode solution. 1. = 1.5  $\gamma$ /ml dl-adrenalone. 2. = 1  $\gamma$ /ml Apicur Roche.

c) Ergotamine and adrenalone: Ergotamine in conc. 0.3—0.6  $\gamma$ /ml (time of action 10—15 min) abolishes completely and reversibly the inhibiting action of dl-adrenalone (0.5—3  $\gamma$ /ml).

There is no difference between adrenalone, arterenol and adrenaline with regard to the dose of bee venom or ergotamine necessary for complete abolishment of an inhibiting effect of given strength.

### Adrianol.



The literature is reviewed by EMILSSON (1942).

#### *Own investigations:*

a) Effect of l- and d-adrianol: The action of l- and d-adrianol on isolated rabbit's intestine has been described in detail in a previous paper (EMILSSON 1942).

b) Bee venom and adrianol: Bee venom in conc. 0.11—1.1  $\gamma$ /ml in most cases completely abolishes the inhibiting action of l-adrianol (0.3—0.8  $\gamma$ /ml). (See Fig. 2.) It seems to be particularly difficult to wash out the bee venom in this case; in exceptional cases it is impossible and the inhibiting action of l-adrianol does not appear again with full strength.

It will be especially noticed that bee venom abolishes the inhibiting action of 1-adrianol in lower doses and more regularly than that of anyone of the other drugs — adrenaline included — which have been investigated. The difficulty to wash out the bee venom and thus to obtain a reversible antagonizing effect also is unique for 1-adrianol. Motor wash-effects are particularly frequent in experiments with 1-adrianol.



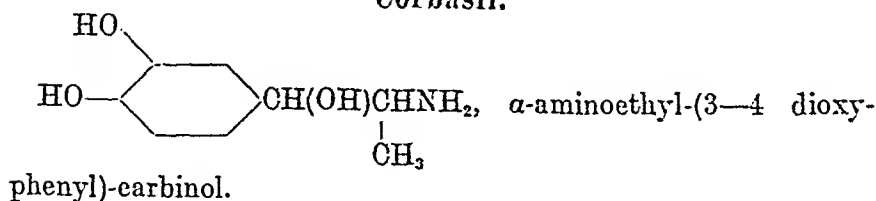
Figure 2. Isolated rabbit's small intestine in Tyrode solution. 1. = 0.6  $\gamma$ /ml 1-adrianol. 2. = 0.3  $\gamma$ /ml Apicur Roche.

The motor effect of d-adrianol in conc. 0.5—2  $\gamma$ /ml is too weak and difficult to reproduce to allow any conclusions from combined experiments with sympathicolytic drugs.

The inhibiting action of d-adrianol in conc. 300—700  $\gamma$ /ml is completely abolished by bee venom in conc. 0.5—2  $\gamma$ /ml. What has been said above above 1-adrianol with regard to the difficulty to wash out the bee venom and the great frequency of motor wash-effects applies to d-adrianol also.

c) Ergotamine and adrianol: Ergotamine in conc. 0.3—0.6  $\gamma$ /ml completely and reversibly abolishes the inhibiting action of 1-adrianol (0.3—0.8  $\gamma$ /ml) or d-adrianol (300—700  $\gamma$ /ml).

### Corbasil.



The literature dealing with corbasil is reviewed by EMILSSON (1942).

*Own investigations:*

a) Action of l- and d-corbasil: The action of l- and d-corbasil on isolated rabbit's intestine has been described in detail in a previous paper. (EMILSSON 1942).

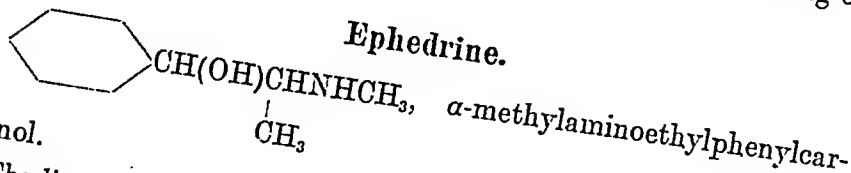
b) Bee venom and corbasil: Bee venom in conc. 0.4—1  $\gamma$ /ml does not in any way affect the inhibiting action of l-corbasil (0.1—0.3  $\gamma$ /ml). In higher conc. (1—25  $\gamma$ /ml) bee venom regularly diminishes the inhibiting action of l-corbasil on the pendulum movements whereas the fall of tone in most cases is not decreased. Only in exceptional cases the inhibiting effect is completely abolished. As bee venom in conc. about 0.5  $\gamma$ /ml completely annuls the inhibiting action of adrenaline on the same segments of intestine it will be evident that it is necessary to use a larger dose of bee venom to diminish an inhibiting effect of l-corbasil than to completely abolish an equally strong inhibiting effect of l-adrenaline.

The augmenting effect of d-corbasil in conc. 0.3—0.6  $\gamma$ /ml is too weak and difficult to reproduce to allow any combined experiments with sympathicolytic drugs.

Bee venom in conc. 1—20  $\gamma$ /ml diminishes the inhibiting action of d-corbasil (20—70  $\gamma$ /ml); in exceptional cases the effect is completely abolished.

c) Ergotamine and corbasil: Ergotamine in conc. 0.3—1  $\gamma$ /ml (time of action 10—15 min) completely and reversibly abolishes the inhibiting action of l-corbasil (0.1—0.3  $\gamma$ /ml) or d-corbasil (20—70  $\gamma$ /ml). There seems to be no difference between l-adrenaline, l-corbasil and d-corbasil as to the dose of ergotamine necessary for complete annulment of an inhibiting effect of given strength.

**Ephedrine.**



binol.

The literature dealing with the action of ephedrine on isolated rabbit's intestine is reviewed by EMILSSON (1942).

*Own investigations:*

a) Action of ephedrine: The action of d-, l- and dl-ephedrine has been described in a previous paper. (EMILSSON,



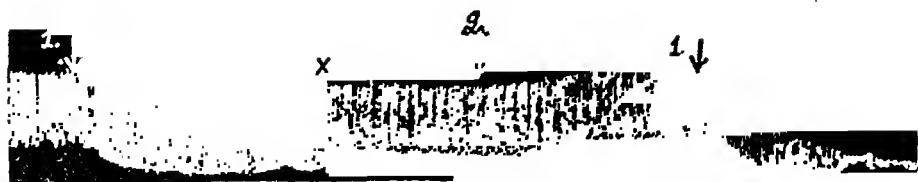


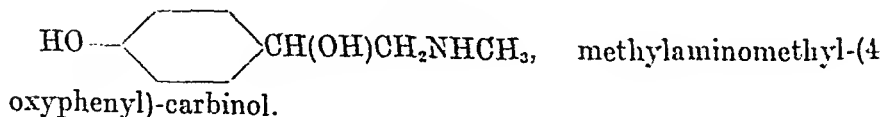
Figure 3. Isolated rabbit's small intestine in Tyrode solution. 1. = 250  $\gamma$ /ml dl-ephedrine. 2. = 12  $\gamma$ /ml Apiecur Roche. X. = washing three times.

1942.) As the isomers have an identical action they are in the following comprised as ephedrine.

b) Bee venom and ephedrine: Bee venom in conc. 0.01—20  $\gamma$ /ml does not in any way affect the inhibiting action of ephedrine (50—1000  $\gamma$ /ml) on isolated rabbit's intestine. (See Fig. 3.) On the same segments of intestine bee venom in conc. 0.1—0.5  $\gamma$ /ml completely antagonizes the inhibiting action of l-adrenaline. (0.06—0.14  $\gamma$ /ml.) It may be emphasized that a great many combined experiments with bee venom and ephedrine have been performed, all with the same result. Therefore the evidence may be considered as quite conclusive.

c) Ergotamine and ephedrine: In conc. which completely abolish the inhibiting action of adrenaline on isolated rabbit's intestine (0.3—0.6  $\gamma$ /ml), ergotamine does not affect the inhibiting action of ephedrine (50—1000  $\gamma$ /ml). If the conc. of ergotamine is increased to 1.4—3.2  $\gamma$ /ml the results are rather variable. In some cases the inhibiting action of ephedrine is not affected. In other cases the fall of tone or the decrease of amplitude or both are considerably diminished; after repeated washings during 1 hour, the inhibiting effect appears again with full strength. However, it must be emphasized that *complete* annulment by ergotamine of the action of ephedrine was never observed.

### Sympatol.



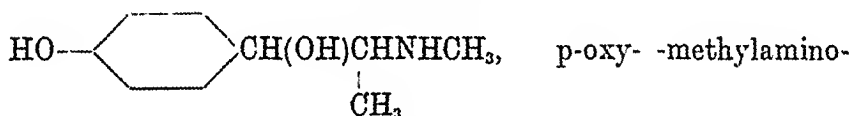
The literature dealing with the action of sympatol on isolated intestine has been reviewed by EMILSSON (1942).

*Own investigations:*

a) *Effect of sympatol*: The effect of l- and d-sympatol on isolated rabbit's intestine has been described in a previous paper (EMILSSON 1942).

b) *Bee venom and sympatol*: Bee venom in conc. up to 20  $\gamma$ /ml does not in any way affect the inhibiting action of l- or dl-sympatol (25—1200  $\gamma$ /ml) on isolated rabbit's intestine. On the same segments of intestine bee venom in conc. 0.05—0.5  $\gamma$ /ml completely abolishes the inhibiting action of l-adrenaline (0.05—0.10  $\gamma$ /ml).

c) *Ergotamine and sympatol*: The inhibiting action of l- and dl-sympatol (25—1200  $\gamma$ /ml) on isolated rabbit's intestine is not in any way affected by previous addition of ergotamine in conc. 0.3—140  $\gamma$ /ml (time of action 10—20 min).

**Suprifen.**

ethylphenyl-carbino!, p-hydroxyephedrine.

In his fundamental pharmacodynamical investigation of oxyephe-drines SCHAUMANN (1931) reports that suprifen inhibits the isolated rabbit's small intestine; the inhibiting activity is about  $\frac{1}{300}$  of adrenaline. The effect is not similar to that of adrenaline, as it develops gradually and slowly.

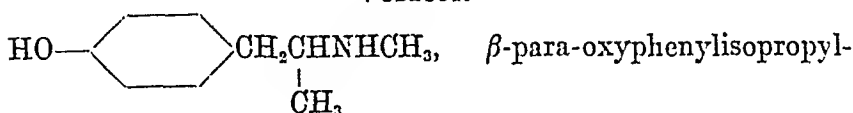
*Own investigations:*

a) *Effect of suprifen*: Suprifen inhibits the isolated rabbit's small intestine in conc. 100—250  $\gamma$ /ml (fall of tone and decrease of amplitude, in some cases complete paralysis of the pendulum movements). The effect is quite similar to the inhibiting effect of ephedrine or sympatol; it develops gradually and slowly and often shows a »motorial peak». The effect may be reproduced again and again.

b) *Bee venom and suprifen*: Bee venom in conc. up to 20  $\gamma$ /ml does not in any way affect the inhibiting action of suprifen (100—250  $\gamma$ /ml). On the same segments of intestine bee venom (0.04—0.5  $\gamma$ /ml) completely abolishes the inhibiting action of adrenaline (0.04—0.14  $\gamma$ /ml).

c) Ergotamine and suprifén: The inhibiting action of suprifén (100—250  $\gamma$ /ml) is in some cases not affected by previous addition of ergotamine (0.4—1.4  $\gamma$ /ml); in other cases the inhibiting action may be somewhat decreased (compare aphedrine) but never completely abolished.

### Veritol.



methylaniline.

ZIPF (1938) reports that veritol inhibits the isolated rabbit's intestine in conc. 40—200  $\gamma$ /ml; the author concludes that veritol acts on the sympathetic nerve endings and receptors. SCAFFIDI (1938) states that veritol in conc. higher than 40  $\gamma$ /ml increases the tone but decreases the amplitude of the isolated rabbit's and guinea pig's small intestine. By previous addition of ergotamine the response to veritol is diminished to a short and moderate increase of tone. According to SCAFFIDI veritol partly stimulates the smooth muscle, partly but less intensively acts on the sympathetic nerve endings. REIS (1940) finds the isolated intestine of the cat, rabbit and rat very insensitive to veritol; inhibition is found in conc. above 100  $\gamma$ /ml. WEBER (1939) reports only stimulation (increase of amplitude and in some cases of tone) of the isolated rabbit's intestine by veritol in conc. 4—80  $\gamma$ /ml.

### Own investigations:

a) Effect of veritol: Occasionally veritol in conc. 1.5—40  $\gamma$ /ml has a very weak augmenting effect. At a conc. of about 85  $\gamma$ /ml veritol regularly stimulates the intestine (almost instantaneous increase of tone but only in exceptional cases increase of amplitude). The effect is rather difficult to wash out. Often it cannot be reproduced, as the increase of tone becomes smaller every time; in some cases the motor effect may change to an inhibitory one upon repeated addition of veritol.

Veritol in conc. 180—250  $\gamma$ /ml always has a moderate or strong inhibiting action — the tone is strongly decreased, the amplitude may be unaffected but is in most cases decreased; in some cases complete paralysis of the pendulum movements is observed. In most cases a »motorial peak» is seen immediately following the introduction of the drug. The effect is rather difficult to wash out; with the exception of the »motorial peak» the repeated reproduction is quite feasible.

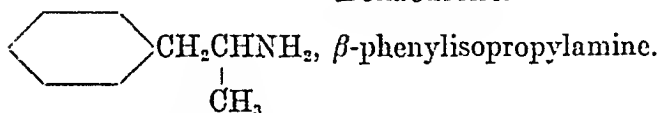
Occasionally effects of a most peculiar type are observed. At a conc. of about 85  $\gamma$ /ml a rapidly passing »motorial peak» (increase of tone, decrease of amplitude), the intestine then immediately returns to the initial state. In occasional cases 250  $\gamma$ /ml veritol may give an instantaneous and very strong increase of tone; the tone gradually sinks to its original position, while the amplitude is greatly diminished all the time.

b) Bee venom and veritol: Owing to the above mentioned difficulty to reproduce the motor effect of veritol the results of the combined experiments with bee venom and this effect are less conclusive. In most cases bee venom (0.1—0.2  $\gamma$ /ml) abolishes the motor effect of veritol in conc. about 85  $\gamma$ /ml but only in exceptional cases the effect reappears unchanged after the washing out of the bee venom.

Bee venom in conc. up to 20  $\gamma$ /ml does not in any way affect the inhibiting action of veritol (180—250  $\gamma$ /ml). On the same segmentes of intestine bee venom in conc. 0.04—0.5  $\gamma$ /ml completely abolishes the inhibiting action of adrenaline (0.04—0.08  $\gamma$ /ml).

c) Ergotamine and veritol: Ergotamine in conc. 0.42—1.4  $\gamma$ /ml does not in any way affect the inhibiting action of veritol (180—250  $\gamma$ /ml).

### Benzedrine.



PATEK and THIENES (1934) tested the action of benzedrine on the isolated rabbit's small intestine. They found in some cases a motor effect at a conc. of 50  $\gamma$ /ml, but in most cases benzedrine had no effect either in this dosage or in higher ones. DETRICK, MILLIKAN, MODERN and THIENES (1937) report that benzedrine inhibits the ileum and colon of the cat in conc. 2—10  $\gamma$ /ml; these low conc. are without effect on tissues of rabbit or guinea pig. Conc. of 100  $\gamma$ /ml first cause inhibition and then a prolonged contraction of cat ileum and duodenum; rabbit and guinea pig intestine is not affected or augmented. Previous addition of ergotamine decreases the inhibitory phase in the action of benzedrine on cat duodenum, the motor phase is less affected. The authors conclude that the experiments do not support either a sympathicotropic or musculotropic mechanism of action.

BOYD (1938) finds the predominant feature of the action of benzedrine (conc. 10—100  $\gamma$ /ml) on isolated rabbit's small intestine to be prolonged, spastic type of contraction. The action is not affected by

previous addition of cocaine, ergotamine or atropine and the author concludes that the effect is not related to the sympathetic or parasympathetic nervous system but due to direct stimulant action upon the muscle fibers. CHISTONI and BECCARI (1939) report that benzedrine stimulates the isolated rabbit's small intestine in conc. 100  $\gamma$ /ml (increase of tone but diminution of amplitude); in conc. 125—1000  $\gamma$ /ml it inhibits the intestine (decrease of tone, complete paralysis of the pendulum movements). The authors consider the inhibiting action similar to that of adrenaline, only weaker. MARRI and FRANCESCHINI (1939) find stimulation (increase of tone and amplitude) of rabbit's intestine by benzedrine in conc. 50—100  $\gamma$ /ml.

Most recently EKERFORS (1941) reports that benzedrine has a motor action on the isolated rabbit's small intestine in weak conc. (10—50  $\gamma$ /ml). In larger doses (100—500  $\gamma$ /ml) it has a three-phase dynamic effect: first a fall in tone and contraction height, then an increase of tone, often accompanied by intensified contractions and finally a slowly progressing fall of tone. The motor action is not in any way checked by atropine, and the primary inhibiting action is not influenced by previous addition of bee venom. The author concludes that «probably, this substance's primary and inhibiting, and secondary and motor dynamic actions on rabbit's small intestine are the manifestations of a multiphased *muscle action*, in which the substance's other inhibitory action is also a tertiary link».

#### *Own investigations:*

a) *Effect of benzedrine:* In conc. less than 8  $\gamma$ /ml benzedrine does not affect the isolated rabbit's intestine. Conc. 40—70  $\gamma$ /ml usually have a weak or moderate motor action (increase of tone but not of amplitude). The effect is easy to wash out and in most cases may be reproduced several times. If the conc. is increased to more than 80  $\gamma$ /ml benzedrine regularly has a strong inhibiting action. The amplitude diminishes rapidly and often uniformly; in most cases the pendulum movements finally are completely paralyzed. The tone is unaffected or decreased. In many cases the inhibiting effect is preceded by a weak and short increase of tone (second motor phase according to EKERFORS). In a few cases the three phase action described by EKERFORS has been observed. The repeated reproduction of the effect — with the exception of the motor phase — is quite feasible. The effect is very easy to wash out; after one washing the mobility of the intestine is quite restored.

b) *Bee venom and benzedrine:* In some experiments the motor action of benzedrine (70  $\gamma$ /ml) was abolished by bee venom in conc. 0.1—0.2  $\gamma$ /ml, but in most cases the motor effect did not return even after repeated washings.

In one experiment the motor action of 70  $\gamma$ /ml benzedrine was reversed into a weak inhibitory effect by previous addition of bee venom (0.7  $\gamma$ /ml). After repeated washings with fresh Tyrode solution the motor effect could be reproduced unchanged.

The results of the combined experiments with bee venom and the motor benzedrine effect seem difficult to interpret and may not be regarded as quite conclusive.

The inhibiting action of benzedrine (80—130  $\gamma$ /ml) is not in any way affected by bee venom in conc. up to 20  $\gamma$ /ml. (See Fig. 4.) On the same segments of intestine bee venom in conc. 0.04—0.3  $\gamma$ /ml completely abolishes the inhibiting action of adrenaline (0.04—0.06  $\gamma$ /ml).



Figure 4. Isolated rabbit's small intestine in Tyrode solution. 1. = 110  $\gamma$ /ml benzedrine. 2. = 14  $\gamma$ /ml Apicur Roche

c) Ergotamine and benzedrine: Ergotamine in conc. 0.42—14  $\gamma$ /ml (time of action 15—20 min) does not in any way change the inhibiting action of benzedrine (80—130  $\gamma$ /ml).

### Discussion.

As to their inhibiting action on the isolated rabbit's small intestine the investigated drugs may be classified in the following way:

I. Adrenaline, adrenalone, arterenol, l- and d-corbasil, l- and d-adrianol.

This group is characterized by:

1) the inhibiting action is of the well known »adrenaline-type», i. e. the effect is momentary and transient.

2) the inhibiting action is completely and reversibly abolished by bee venom and ergotamine in sufficient doses.

II. l- and d-ephedrine, suprifin, l- and d-sympatol, veritol, benzedrine.

In contrariety to group I this group is characterized by:

1) the inhibiting effect develops gradually and slowly; in several cases it shows a primary motor phase (»motorial peak»); there is

no recovery without washing and the effect often is difficult to wash out.

2) the inhibiting action is not abolished by previous addition of bee venom or ergotamine even in maximal doses.

According to a generally accepted theory the action of adrenaline is due to a combination of the drug with specific receptors on the cell surface. The selective action depends on two factors, firstly, the power to combine with the receptors, and secondly, the power to produce an effect after they have combined (CLARK 1937). The drugs belonging to group I have an action on isolated rabbit's intestine, which is qualitatively identical or almost identical with that of adrenaline. Whether the action is due to direct combination with the specific receptors or to stimulation of the sympathetic nerve endings followed by liberation of chemical transmitter is in this connection of no importance.

Sympathicolytic drugs antagonize the action of adrenaline by blocking the specific receptors, to which they have a very great »Haftförmigkeit» (MALORNY and ORZECOWSKI 1940). Therefore, it is evident that the drugs belonging to group II, the inhibiting action of which is not abolished by sympathicolytica, cannot produce their inhibiting effect by acting on the sympathetic receptors or on the sympathetic nerve endings, but the action must be due to *direct muscular depression*.

The general appearance of the intestinal effects belonging to group II is in complete accordance with this theory. The frequently observed motorial peak — which accepting a neural theory of action may seem rather unexplainable — may be regarded as the first motor phase of a two or three phase muscular effect.

From the chemical structure of the investigated drugs, it will be evident that the substances belonging to group I all contain a hydroxylgroup in meta-position, while those belonging to group II do not.

There are some minor deviations from the general classification and characterization of the investigated drugs outlined above. Thus, the inhibiting action of ecrbasil is unexpectedly difficult to abolish completely with bee venom. Ergotamine in some cases reversibly diminishes the inhibiting action of epedrine and sup-rifen. Considering the complexity of the problem of drug antagonism these deviations are by no means surprising; a concrete explanation seems difficult to give.

TAINTER (1930, 1931, 1932, 1933) has classified the sympatho-

mimetic amines as »sympathicotropic» and »musculotropic» with regard to the influence of cocaine on their circulatory action. This classification in main features agrees with mine as to the action on isolated rabbit's intestine.

Experiments on isolated intestine do not allow exact quantitative treatment without considerable difficulties. It is evident that if the dose of adrenaline is increased it is necessary to add a larger dose of the sympathicolytic drug to obtain complete abolishment of the inhibiting action. If two adrenaline substitutes are compared the dose of the sympathicolytic drug necessary for complete annulment of the inhibiting action, is not proportional to the conc. of adrenaline-like drug but to the strength of the inhibiting effect. Thus, l-adrenaline gives an inhibiting effect equal to an about 100 000 times larger dose of d-adrianol; the same dose of bee venom completely abolishes the action in both cases.

### Summary.

1. The action of a number of adrenaline substitutes on isolated rabbit's small intestine in Tyrode solution has been studied.

2. All the investigated drugs inhibit the intestine, if the dose is sufficiently large. Ephedrine, benzedrine, veritol, d-sympatol, d-corbasil and d-adrianol stimulate the intestine in lower conc.

3. With regard to their inhibiting action the investigated drugs may be classified as follows.

I. adrenaline, adrenalone, arterenol, d- and l-corbasil, d- and l-adrianol.

This group is characterized by

a) the inhibiting action is of the wellknown »adrenaline-type»,  
i. e. the effect is momentary and transient.

b) the inhibiting action is completely and reversibly abolished by bee venom and ergotamine in sufficient doses.

II. d-, l- and dl-ephedrine, suprifren, veritol, d- and l-sympatol, benzedrine.

In contrariety to group I this group is characterized by:

a) the inhibiting effect develops gradually and slowly, in several cases it shows a primary motor phase (»motorial peak»); there is no recovery without washing and the effect is often difficult to wash out.

b) the inhibiting action is not abolished by bee venom or ergotamine even in maximal doses.



4. It is concluded that the inhibiting action of the drugs belonging to group II cannot be due to action on the sympathetic nerve endings or the specific receptors but must be due to *direct muscular depression*.

5. From the chemical structure of the investigated drugs it will be evident that the substances belonging to group I contain a hydroxyl-group in meta-position, while those belonging to group II do not.

### References.

- AUMANN, K. W. and W. B. YOUMANS: Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. 1939, *42*, 11.
- BERGENHEM, B. and H. RYDIN: in manuscript.
- BOYD, E. M., Amer. J. med. Sci. 1938, *195*, 445.
- CHISTONI, A. and E. BECCARI: Boll. soc. ital. Biol. sper. 1939, *14*, 612.
- CLARK, A. J.: General Pharmacology in Heffters Handbuch d. exp. Pharmak. Ergw. V. 1937.
- DETRICK, L. E., R. MILLIKAN, F. S. MODERN and C. H. THIENES: J. Pharmacol. 1937, *60*, 56.
- EKERFORS, H.: Uppsala läkareförenings förhandl. 1941, *46*, 169.
- EMILSSON, B.: Acta Physiol. Scand. 1942, *3*, 275.
- GREER, C. M., J. O. PINKSTON, J. H. BAXTER JR, and E. S. BRANNON: J. Pharmacol. 1938, *62*, 189.
- MALORNY, G. and G. ORZECOWSKI: Ibidem. 1940, *196*, 245.
- MARRI, R. and G. FRANCESCHINI: Arch. di scienze biologiche. 1939, *25*, 7.
- MENDEZ, R.: J. Pharmacol. 1928, *32*, 451.
- NANDA, T. C.: Ibidem. 1931, *42*, 9.
- PATEK, P. and C. H. THIENES: Arch. int. Pharmacodyn. 1934, *47*, 240.
- PLANELLES, J.: Arch. exp. Path. Pharmak. 1924, *138*, 105.
- REIS, A.: Quart. J. exp. Physiol. 1940, *30*, 1.
- RICHTER, R.: Arch. exp. Path. Pharmak. 1938, *189*, 172.
- ROTHLIN, E.: J. Pharmacol. 1929, *36*, 657.
- SCAFFIDI JR, V.: Riv. di pat. sper. 1938, *20*, 265.
- SCHAUMANN, O.: Arch. exp. Path. Pharmak. 1931, *160*, 127.
- SJÖVALL, T.: Uppsala läkareförenings förhandl. 1939—40, *45*, 97.
- TAINTER, M. L.: Quart. J. Pharm. Pharmacol. 1930, *3*, 584.
- , Arch. int. Pharmacodyn. 1931, *41*, 365.
- , Ibidem. 1932, *42*, 128.
- , Ibidem. 1933, *46*, 192.
- WEBER, W.: Die Beeinflussung der Wirkung von Adrenalin, Corbasil, Sympatol, Veritol und Ephedrin am isolierten Kaninchendünndarm durch Ascorbinsäurezusatz, Göttingen 1939. Diss.
- ZIFF, K.: Arch. exp. Path. Pharmak. 1938, *189*, 679.

## After Potentials in Mammalian Voluntary Muscle.

By

C. G. BERNHARD and U. S. v. EULER.

(Received 18 February, 1942.)

— — —

Under certain conditions the rapid spike potential accompanying the muscular twitch is followed by a slow potential of varying duration and much smaller in amplitude than the spike.

Slow muscle potentials have been studied in the frog's sartorius by SCHAEFER and his associates (1936, 1937, 1938) and recently by ROSENBLUETH, WILLS and HOAGLAND (1941) on mammalian muscle. Among the chief properties of the slow muscle potential may be mentioned: it appears almost immediately after the spike and is of comparatively long duration. Its maximal amplitude is low as compared with spike and generally amounts only to a few per cent of the spike height. In most cases the slow potential is maximal at, or shortly after, its onset and then gradually falls.

In the present paper some observations are reported on slow muscle potentials in connexion with the variations in muscle tension of single twitches in mammalian white muscle before and after a short tetanus. As shown by BROWN and EULER (1938), the spike potential of a single twitch, led off with silver pins from belly and tendon, is generally reduced after a tetanus, though a sometimes very striking increase of the twitch tension is observed during these conditions.

### Methods.

Cats in chloralose anaesthesia were used in all the experiments. The tibialis anticus muscle was prepared according to the technique

used by BROWN and v. EULER (1938) and stimulated indirectly by silver electrodes on the sciatic nerve in the thigh. The sciatic was tied centrally to the point of stimulation, and the tibial nerve crushed in the popliteal region. The stimulating condenser shocks were obtained from a neon lamp stimulator. Action potentials were led off from the surface of the muscle belly and the tendon, by means of cotton wool wicks soaked in Ringer solution and attached to chlorinated silver electrodes. The cotton wool wicks were long enough to follow the slight movements of the isometrically contracting muscle.

The action potentials were led to a 3-stage, directly coupled amplifier in conjunction with a cathode ray oscillograph.<sup>1</sup> The amplifier showed very little drift even at high amplifications. In order to make the action potentials more monophasic, the tendon was treated with KCl in substance and with heat. The muscle tension was recorded optically with a Brown-Schuster flat-spring myograph, connected with a wire to a reflector, which directed the light into a camera. The muscle tension curve and the electrogram were thus printed simultaneously on the photographic paper. Owing to the mechanical transmission, slight irregularities occur in some of the curves. Precautions were taken to keep the muscle moist and to avoid excessive cooling.

Injections of a 1 per cent potassium chloride solution into the muscle were made through the peripheral part of the tibial artery in central direction. During the injection the tibial artery just below the knee was occluded by means of a loop of thread. In this way a local administration of KCl to the muscle could be achieved without undue handling of the tibialis anticus muscle.

## Results.

### 1. The Single Shock After Potential in Muscle and the Building up of a Summed Negativity with Repetitive Stimuli.

A typical result with simultaneous recording of muscle tension and slow muscle potentials in the tibialis anticus stimulated indirectly is given in fig. 1, with single shocks (a), repeated stimuli (b) of various frequencies (5, 9, 25 and 50/sec) and single shocks again 6 (c), 30 (d) and 60 (e) sec after the end of repetitive stimulation.

On account of the high amplification necessary for recording the slow potentials, the spike potentials are not reproduced in the curves and will not be specially referred to here. In control records with low amplification the spike potentials were of a fairly monophasic type. In all records upward deflection denotes negativity in the electrode on the muscle. The slow negative potential change

<sup>1</sup> The amplifier was designed by the physicist of the Neurophysiological laboratory, T. HELME.

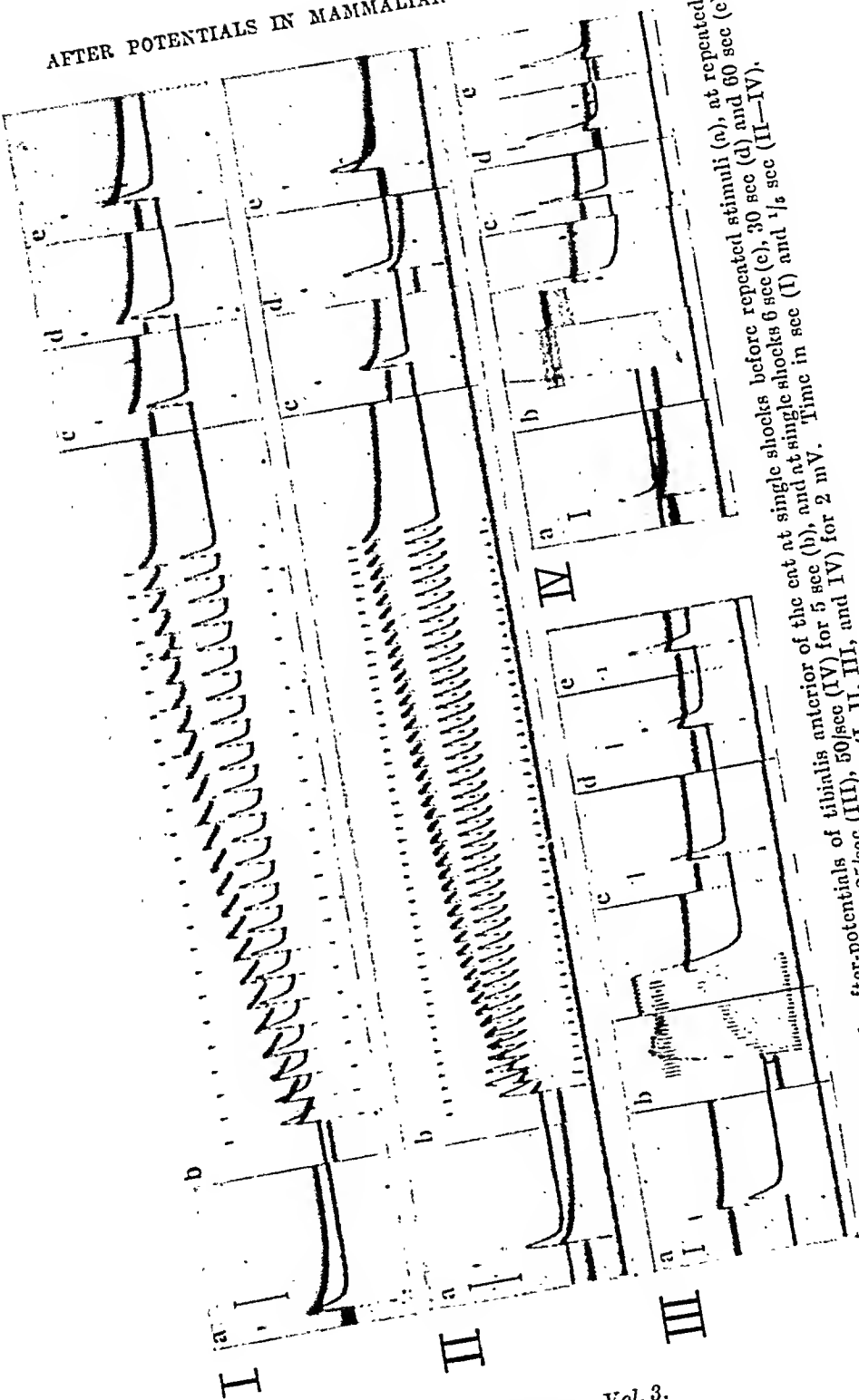


Fig. 1. Myogram and muscle after-potentials of tibialis anterior of the cat at single shocks before repeated stimuli (a), at repeated stimuli of frequencies 5/sec (I), 9/sec (II), 25/sec (III), 50/sec (IV) for 5 sec (b), and at single shocks 6 sec (c), 30 sec (d) and 60 sec (e) after repeated stimuli. Time in sec (I) and  $\frac{1}{16}$  sec (II—IV). Calibration in all series (I, II, III, and IV) for 2 mV.

(negative after potential, NAP), following the spike, was usually of the order of 0.5—1.5 mV. The configuration of the NAP varied (cf SCHAEFER and SCHÖLMEICH, 1938), but in most instances it was of the type illustrated in fig. 1. A typical feature was the exponential fall towards the base line and the comparatively long duration, which considerably exceeded that of the contraction.

At a stimulating frequency of 5/sec (fig. 1, I b) the muscle contractions are still fully separated, whereas the NAP following each shock did not reach the base line. For this reason the base line is raised by each subsequent stimulus. At the end of the stimulation period (about 5 sec) the negativity level had increased to a value of about 2.7 mV, if the NAP following the last shock is not taken into account.

However, during repeated stimuli of this type, the NAP is subject to certain successive changes after each shock, which are of importance for the course of the ensuing negativity. On the one hand the amplitude of the NAP decreased after each stimulus. This diminution of the amplitude appeared mainly in the first part of the stimulation period. At a frequency of 5/sec the NAP after 2 sec had fallen to about 65 per cent of the initial value. Thereafter the reduction was only slight (fig. 2).

On the other hand, the falling part of the NAP shows a steeper slope towards the raised base line during repeated stimulation. When the NAP of the last shock in the series (fig. 1 b) is compared with that of the single shock in fig. 1 a, it is observed that the NAP in the former case has almost reached the elevated base line after  $\frac{1}{3}$  sec, whereas the NAP following the normal single shock reaches the base line only after about 1 sec. These changes of the NAP during repeated stimulations lead to the consequence that the summed negativity during the period of stimulation increases at a rapid rate in the first part and then slowly approaches a maximum. The final negativity should thus be dependent on the *duration of the period of stimulation* up to a certain limit, and control experiments with varying periods of stimulation have shown that this actually is the case.

The *frequency of the repeated stimuli* is also of importance for the building up of the negativity (cf. records b in fig. 1, I and II). As might be expected, the negativity increases more rapidly and reaches a higher level at the frequency 9/sec than at the frequency 5/sec during the same period of stimulation (5 sec), since, in the former case, the return of the NAP between each stimulus

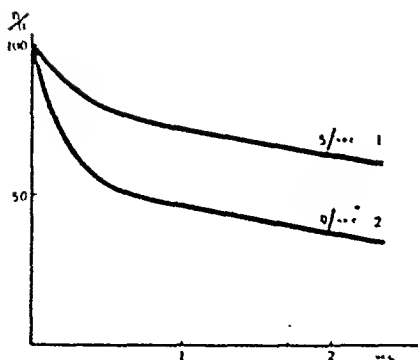


Fig. 2. Diminution of the NAP amplitude at repeated stimuli with frequencies 5/sec (1) and 9/sec (2) for 2 sec. The amplitude of NAP is given on the ordinate in per cent of the value at single shocks before repeated stimuli.

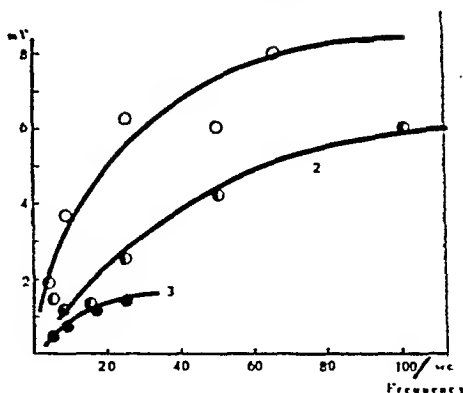


Fig. 3. Post-tetanic negativity plotted against stimulus frequency in three different preparations (1, 2, and 3, see text). In all experiments the duration of the repeated stimuli was 5 sec.

becomes less complete. On the other hand, the increase of the negativity at higher frequencies is counteracted to a certain extent by the fact that the NAP of separate stimuli are reduced earlier in this case and to a greater extent, which is illustrated in curve 2 of fig. 2. At the frequency 25/sec an incomplete tetanus occurs (fig. 1, record III b), and the negativity reaches 6.7 mV after 5 sec stimulation. Finally, at a tetanic stimulation of 50/sec (fig. 1, record IV b) the post-tetanic negativity attains a value of 8.4 mV after the same period of stimulation. The relation of the negativity to the frequency during a constant period of stimulation is illustrated in fig. 3, which is based on 3 different experiments.

When the stimulating frequency exceeded 100/sec, varying results were obtained. Our general impression is, however, that a maximal effect is reached at frequencies around 100/sec, as indicated by fig. 3. The experiments speak in favour of the assumption that the considerable post-tetanic negativities which are found after stimulation frequencies of 25 and 50/sec in fig. 1, III and IV are built up in a way corresponding to those directly observed at the lower frequencies 5 and 9/sec (fig. 1, I and II). This is also corroborated by other experiments in which the building up of the negativity can be followed after groups of frequent stimuli.

If the negativity after repeated stimuli is built up by summation of the separate NAP, as assumed above, then the amplitude of the post-tetanic negativity ought to be largely dependent on the

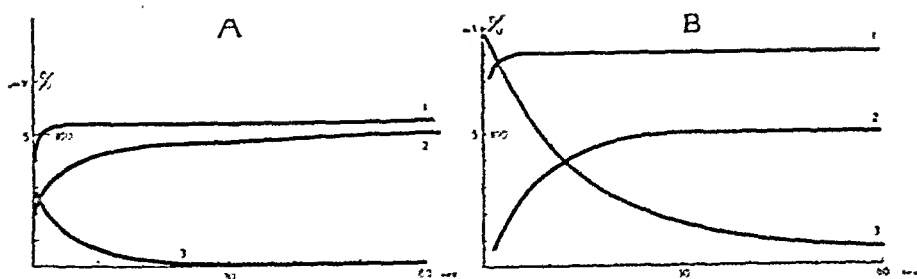


Fig. 4. Twitch tension (1), amplitude of muscle after-potentials (2) at single shocks and amplitude of post-tetanic negativity (3) during 60 sec after repeated stimuli for 5 sec with frequencies 9/sec (A) and 50/sec (B). The amplitude of muscle twitches (1) and after-potentials (2) are given in per cent of the values before repeated stimuli. Post-tetanic negativity (3) in mV.

basic shape of the single NAP. As already pointed out, this may vary, no doubt partly depending on the state of the muscle. For several reasons we believe that the shape shown in fig. 1 is to be regarded as the «normal». The NAP then early reaches a maximum and falls along an exponential curve. Fig. 5a shows a different type of NAP, of lower amplitude and with a later and more prolonged maximum. The post-tetanic negativity after 5 sec stimulation at 25/sec in this case had an expected lower amplitude and longer duration.

In fig. 3 are illustrated graphically the results obtained from three different preparations (curves 1, 2, and 3), where the single NAP showed varying amplitude shape. In the diagram the ensuing post-tetanic negativity is plotted against the stimulus frequency. The curves thus show how the former increases with frequency of stimulation, but in a different degree in the three cases. In all the experiments the duration of the stimulus was 5 sec. Curve 1 is from a preparation where the NAP appeared early and had a high amplitude (1.29 mV), whereas curve 3 shows the post-tetanic negativity at different frequencies in a preparation where the single NAP appeared comparatively late and only reached a value of 0.2 mV (presumably as a consequence of traces of KCl on the muscle surface). Curve 2 was obtained from a preparation where the NAP had an intermediate shape between those in 1 and 3. The amplitude in this case was 0.89 mV. It is evident from the curves that the building up of the total negativity bears a certain relation to the shape and the amplitude of the NAP of the single stimulus. When this is slow and low (fig. 3, curve 3), a maximum is reached at a relatively low frequency

(about 25/sec.) and is fairly small (about 1.6 mV). The higher the NAP and the earlier its maximum the higher is the frequency required to attain the maximal amplitude in the post-tetanic negativity during a given period of stimulation. At the same time higher amplitude values are reached.

We also found a difference between the post-tetanic negativity in the rested and the *fatigued muscle*, the latter negativity being smaller. In agreement with this, the individual NAP is reduced after prolonged tetanic activity.

## 2. The Post-Tetanic Negativity, the NAP and the Muscle Contractions at Post-Tetanic Single Shocks.

The negativity occurring after frequent stimuli, the formation of which has been demonstrated above, appears at the end of the stimulation period as a post-tetanic negativity (PTN). A negative potential of this kind has previously been described by BROWN and v. EULER (1938). Summing up the foregoing, the amplitude is dependent on the frequency and duration of stimulation, the shape and size of the single NAP and the state of the muscle. After the cessation of the repetitive stimuli, the negativity falls towards the base line, at first rapidly and then more slowly, and approaches the resting potential asymptotically (see fig. 1, records I—IV b, c, d, and e). The course of the falling phase of the negativity from 2 different levels obtained by stimulation at frequencies 9 and 50/sec, is illustrated in fig. 4, curve 3, A and B.

On the top of the negativity, at the end of the tetanic stimulation, the superimposed single NAP is greatly reduced (cf. records b, fig. 1, I—IV). This reduction is the more marked the higher the frequency and the total negativity. Records c, d, and e in fig. 1, I—IV show the effect of post-tetanic single shocks 6, 30 and 60 sec respectively, after the cessation of the repeated stimuli. As the post-tetanic negativity diminishes with the distance from the end of the tetanus the NAP of the single shocks increases again. When the base line is reached 30—60 sec. after the end of the series of stimuli, the NAP of the post-tetanic single shocks is restored (cf. records e and a in fig 1, I—IV, and fig. 9).

Curves 2 in the fig. 4 diagrams show the increase in amplitude of the NAP during the same period. The NAP is expressed as a percentage of the value before the tetanic stimulation. A comparison between the curves 2 and 3 shows a reversed relation



between the post-tetanic negativity and the NAP of a superimposed single shock, and this relation seems to be expressed by a straight line.

It is also seen that the post-tetanic single NAP is relatively much smaller, when the total negativity (PTN) is high (B), than during small PTN. in fig. 4.

The post-tetanic twitch tension increases rapidly after the end of the tetanic stimulation (fig. 4 A and B curve 1). After 5 sec stimulation at a frequency of 9/sec the post-tetanic potentiation is slight (4 A), whereas the frequency 50/sec gives the wellknown strong potentiation which sets in quickly. Already some seconds after the end of the tetanus, the twitch tension had reached some 140 per cent of the pre-tetanic tension. It is obvious that the time course of the increase in twitch tension (curve 1) does not bear any relation to any of the other processes (curves 2 and 3) shown in the diagrams. Only long after the NAP has recovered and the PTN returned to zero does the post-tetanic twitch potentiation subside.

### 3. Potassium Depolarisation and the Influence of Potassium on the NAP and PTN.

Fig. 5 shows spike potentials and NAP before (a and b) and after (c and d) arterial injections of a 1 per cent solution of KCl. After injection of 1 ml 1 per cent KCl, a slight depolarisation follows, which, measured about 3 mV, and was reversible. When the base line returned to the original level (record c) both twitch and the spike potential had returned to normal values. In this stage record 5 d was taken, with higher amplification, and showed complete absence of any negative after potential in the muscle, though before KCl the NAP had usual appearance. Fig. 6 shows, at high amplifications, the progressive change of NAP after injection of 2 ml 1 per cent KCl in a muscle with a well-developed NAP. Record a is the normal picture, b, c, and d follow in a series after the injection. In the first stage the injection of potassium chloride, the NAP falls more rapidly towards the base line (b), and after this the amplitude is successively reduced. Finally only a small diphasic potential is left. In this preparation the twitch tension was also reduced. It is obvious, however, that the NAP may be completely absent at a stage when twitch tension and spike potential are normal (fig. 5). In the stage of potassium ac-

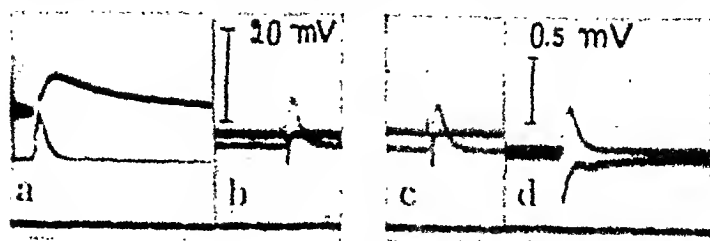


Fig 5

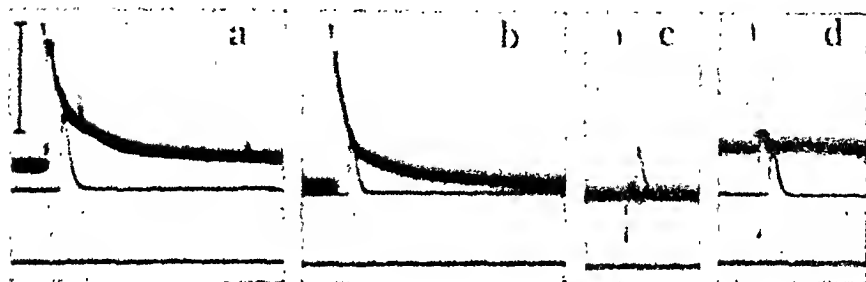


Fig 6

Fig. 5. Muscle twitch, spike potential (b and c) and negative after-potential (a and d) before (a and b) and after arterial injection of 1 ml 1 per cent solution of KCl (c and d). Calibration 20 mV (b and c) and 0.5 mV (a and d). Time in  $\frac{1}{5}$  sec.

Fig. 6. Negative muscle after-potential (NAP) before (a) and at various intervals after arterial injection of 1 ml 1 per cent solution of KCl (b, c, and d). Calibration 2 mV. Time in  $\frac{1}{6}$  sec.

tion when the NAP has disappeared or even been replaced by a positive potential a negative potential could not be built up by repeated stimuli. As might be expected, positive potential then appears after the end of the stimulation period. To the same degree as depolarisation occurs after the potassium injection into the muscle, the NAP disappears and hence the basis for the building up of a negativity.

### Summary.

The spike potential accompanying single isometric twitches in the cat's tibialis anticus muscle elicited by indirect stimulation is followed by a slow potential of negative sign (NAP).

The negative after potential, as a rule, rapidly reaches a maximum and then in about a second approaches the resting potential level.

Repeated stimuli of frequencies of about 5/sec and more give rise to a summed negativity, the magnitude of which depends on the shape of the single NAP and on the frequency and duration of stimulation up to certain limits, persisting for as long as a minute.

At the height of the post-tetanic negativity the single NAP is reduced in amplitude and duration, in inverse proportion to the total negativity. As the total negativity falls after the cessation of the stimuli, the single NAP recovers and reaches its original magnitude when the post-tetanic negativity has passed.

No correlation was found between the degree of potentiation of the post-tetanic twitch tension and the post-tetanic negativity or the single NAP.

Potassium chloride injected into the arteries of the muscle caused the NAP to decrease, or disappear, or even to change into a positive potential. In the latter case the usual post-tetanic negativity was changed into a positive potential. Even in the complete absence of the NAP, the muscle twitch tension and the spike potential may be of normal magnitude.

#### References.

- BROWN, G. L. and U. S. v. EULER: *J. Physiol.* 1938, 93, 39.  
ROSENBLUETH, A., J. H. WILLS and H. HOAGLAND: *Amer. J. Physiol.* 1941, 133, 724.  
SCHAEFER, H.: *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 1936, 237, 329.  
SCHAEFER, H. and H. GÖPFERT: *Ibidem.* 1937, 238, 684.  
SCHAEFER, H. and P. SCHÖLMERICH: *Ibidem.* 1938, 240, 542.

This work has been aided by a grant from the Foundation "Therese and Johan Anderssons Minne".

---

## Über die Reversibilität der Wirkungen von Kohlenmonoxyd auf die Atmung des Frosch-Sartorius.<sup>1</sup>

Von

PER ERIC LINDAHL.

(Eingegangen am 28. Februar 1942.)

---

FENN und COBB (1932 a) untersuchten als erste die Wirkung von Kohlenmonoxyd auf die Atmung der Skelett- und Herzmuskulatur. Sie fanden statt der erwarteten Hemmung eine Erhöhung der Atmung, die in 20 % O<sub>2</sub> + 80 % CO am grössten war und etwa 100 % betrug. Auf Grund einer kräftigen Herabsetzung des RQ in dem CO—O<sub>2</sub>-Gemisch vermuten sie eine Verbrennung von Kohlenoxyd zu Kohlendioxyd. Das Ablaufen dieser Reaktion wird mit Hilfe von Gasanalysen demonstriert (FENN und COBB 1932 b). Auch SCHMITT und SCOTT (1934) finden nur eine Erhöhung der Atmung in Skelett- und Herzmuskulatur und zwar nicht nur bei 20, sondern auch bei 5 % O<sub>2</sub>, was etwa dem physiologischen O<sub>2</sub>-Druck im Organismus entsprechen dürfte, bei dem die Enzymreaktionen stattfinden (vgl. LASER 1937). FENN und COBB (1932 a) geben an, dass die Veränderung der Atmung durch CO vollkommen reversibel bei Ersetzen des CO-Gemisches mit Luft sein soll, eine Aussage, die im Widerspruch mit den wiedergegebenen Kurven steht, die eine bleibende kleinere Erhöhung erkennen lassen. Über die Reversibilität geben SCHMITT und SCOTT an, dass Gewebe, das nach Kohlenoxydbehandlung wieder in Luft überführt ist, bei Beleuchtung eine Atmungserhöhung zeigt. (Entsprechende Ergebnisse habe ich in unpublizierten Versuchen an

---

<sup>1</sup> Herrn Dozent ERNST B. SALÉN danke ich für die freundliche Übermittlung eines Anschlages von dem Gengasbyrå.

verarmter Hefe erhalten). Sie finden ferner im Gegensatz zu FENN und COBB, dass die Atmungserhöhung in CO durch Belichtung verstärkt wird, was ich auch bestätigen kann. Weiter stellte HURSH (1936) fest, dass die Atmung des im CO—O<sub>2</sub>-Gemisch gereizten Muskels im Verhältnis zu der des in Luft gereizten gehemmt ist. Da der von FENN und COBB gebrachte Nachweis einer CO-Oxydation in Muskeln wiederholt angezweifelt worden ist (Literatur s. STANNARD 1941), greift STANNARD erneuert diese Frage mit gasanalytischer Methodik an. Seine Versuche bestätigen zweifellos, dass CO verbrannt wird und zeigen für einige Fälle (durch Nadi-Reagenz oder Coffein erhöhten O<sub>2</sub>-Verbrauch), dass die CO-Oxydation sich zu einer sonst gehemmten Atmung hinzuaddiert. STANNARD erhöht die normale Atmung durch Laktat, Pyocyanin, KCl usw. Auch unter diesen Bedingungen bewirkt CO eine Erhöhung des O<sub>2</sub>-Verbrauches. Aus Hemmungsversuchen mit Jodessigsäure oder deren Amid, Cyanid, Azid und Hydroxylamin schliesst STANNARD, dass die Enzyme, die die Oxydation von CO in Muskeln bewirken, von denen des ruhenden oder aktiven Systems verschieden, aber den letztgenannten ähnlich sind.

Die vorliegende Untersuchung beabsichtigt an einem grösseren Material festzustellen, ob die Einwirkung von CO auf den Stoffwechsel der Skelettmuskulatur reversibel ist oder nicht. Da sowohl die atmungserhöhende wie atmungshemmende Wirkung von CO im Seeigeli bei konstantem CO-Druck stark von dem O<sub>2</sub>-Druck abhängt, wurde versucht, die eventuelle Nachwirkung durch zwei verschieden hohe O<sub>2</sub>-Drucke verschieden zu beeinflussen.

### Material und Methoden.

Intakte Sartoriusmuskeln von *Rana temporaria*, die wegen ihrer verhältnismässig geringen Dicke für Atmungsuntersuchungen am geeignetsten sind, wurden als Material verwendet. Die Tiere (Winterfrösche) entstammten zwei verschiedenen Sendungen (Versuchsreihe A und B, Tab. 1) desselben Fundortes. Die Muskeln wurden unmittelbar nach Dekapitierung der Tiere unter Ringerlösung herauspräpariert und sofort verwendet. Bestimmungen, die verglichen werden sollen, wurden immer an paarweise zusammengehörigen Muskeln ausgeführt. Um genügend grosse Ausschläge zu erhalten, wurden die entsprechenden Muskeln von zwei Tieren für jede Bestimmung benutzt.

Atmungsmessungen wurden nach WARBURG bei einer Temperatur von 22° ausgeführt. Hierfür wurden halbzyindrische Gefässe (Ko<sub>2</sub> 0.70—0.95) benutzt. Zur CO<sub>2</sub>-Absorption wurden 0.7 ml 1 Mol KOH-Lösung auf den Einsatz und die zwei Anhänge verteilt. Das Gewicht der für

ein Gefäß bestimmten Muskeln wurde auf einer Torsionswaage festgestellt und ihr Volumen unter der Approximation berechnet, dass ihr spezifisches Gewicht 1 ist.<sup>1</sup> Das Gesamtvolumen von Muskeln und Ringerlösung im Hauptraum der Gefäße war 2.0 ml. Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurden die Muskeln während 12 Stunden bei 100° getrocknet und gewogen. Da die Atmungsgrösse kontinuierlich im Laufe der Versuche abnimmt, wird sie nicht als  $Q_{O_2}$  sondern als cmm  $O_2$ /mg Trockensubstanz während eines angegebenen Zeitabschnittes (90 Min.) berechnet.

Das CO— $O_2$ -Gemisch bestand in sämtlichen Versuchen aus 80 % CO und 20 %  $O_2$ . Das Kohlenoxyd wurde hergestellt durch Zusammen-tropfen von konz. Schwefelsäure und Ameisensäure in einer auf 100° erhitzten Glasröhrschlinge, aus der das Flüssigkeitsgemisch durch das gebildete Gas dauernd entleert wird. Dieses Verfahren bietet, obwohl weniger wirtschaftlich als die übliche Darstellungsweise, viele Vorteile. Das Kohlenoxyd wurde mit Alkalilauge, konc. Schwefelsäure und Parafinöl gewaschen. Die Gasgemische waren auf etwa 1 % genau.

### Versuche.

Die Versuche wurden folgendermassen ausgeführt: Nachdem die Muskeln in die vorbereiteten Gefäße gebracht waren, wurden die hierfür vorgesehenen mit dem CO— $O_2$ -Gemisch gefüllt. Hierbei wurden 500 ml während 6 Min. unter Schütteln durchgeleitet. Die Atmungsmessung fing 30—40 Min. nach dem Auspräparieren der Muskeln an und dauerte 90 Min. (1. Messperiode). Durch Durchleiten eines kräftigen Gasstromes während 4 Min. (etwa 1,000 ml) beim Schütteln wurde das CO— $O_2$ -Gemisch mit Luft bzw.  $O_2$  ersetzt. Im letztgenannten Falle wurden auch die entsprechenden Kontrollgefäße mit  $O_2$  gefüllt. Nach einer Pause von 30—35 Min. wurde die Atmungsmessung wieder fortgesetzt und dauerte weitere 90 Min. (2. Messperiode).

Es wurden 2 Reihen von Versuchen ausgeführt. In A (Tab. 1) wird die 2. Atmungsmessung in 100 %  $O_2$ , in B in Luft vorgenommen. Tabelle 1 enthält für die beiden Messperioden die Atmung bei dem gewählten  $O_2$ -Druck in Ab- und Anwesenheit von CO sowie die durch CO verursachte Differenz. Die Muskeln der beiden Versuchsreihen verhalten sich verschieden. In A ist die Kontrollatmung der 1. Messperiode wesentlich niedriger als in B. Die Mittelwerte sind für A  $0.81 \pm 0.05$ , für B  $1.30 \pm 0.07$ ; Differenz  $0.49 \pm 0.09$ . Die Muskeln der beiden Versuchsreihen sind

<sup>1</sup> Das spezifische Gewicht des Froschmuskels ist etwa 1.060 (Tabulae biologicae, Bd. 2, S. 319, 1925).

Tabello I.

Die Zahlen bedeuten mm  $O_2$ /mg Trockensubstanz während 90 Min.

Versuchsreihe A				Versuchsreihe B					
1. Messperiode		2. Messperiode		1. Messperiode		2. Messperiode			
$20\% O_2 + 80\% N_2$	$20\% O_2 + 80\% CO$	Differenz	$100\% O_2$	$100\% O_2$	Differenz	$20\% O_2 + 80\% N_2$	$20\% O_2 + 80\% CO$	Differenz	
21. 11. 41 . . .	0.85	+ 0.30	0.76	0.58	- 0.01	1.12	1.48	+ 0.31	0.89
22. 11. 41 . . .	1.01	+ 0.02	0.59	0.62	+ 0.06	1.45	1.26	- 0.39	1.28
23. 11. 41 { I . .	0.73	+ 0.72	0.56	0.45	- 0.03	1.53	1.20	- 0.33	0.92
II . .	0.73	+ 0.45	0.53	0.65	+ 0.23	1.24	1.68	+ 0.44	0.96
III . .	0.43	+ 1.00	0.42	0.58	+ 0.02	1.83	1.39	- 0.44	1.03
25. 11. 41 { I . .	0.91	+ 0.37	0.60	0.84	+ 0.27	1.68	1.36	- 0.32	0.95
II . .	0.70	+ 0.93	0.57	0.58	- 0.01	0.86	1.49	+ 0.63	0.97
26. 11. 41 { I . .	0.71	+ 0.45	0.59	0.58	- 0.01	1.25	1.46	+ 0.21	0.65
II . .	1.11	- 0.00	0.86	0.70	- 0.16	1.90	1.12	- 0.48	0.78
III . .	0.85	+ 0.20	0.65	0.61	- 0.04	1.40	1.26	- 0.14	0.52
27. 11. 41 { I . .	1.05	+ 0.40	0.90	0.83	- 0.07	1.27	1.81	+ 0.57	0.97
II . .	1.16	+ 0.12	1.02	0.77	- 0.25	1.15	1.35	+ 0.20	0.92
III . .	0.65	+ 0.62	0.54	1.08	+ 0.51	1.15	1.38	+ 0.23	0.83
1. 12. 41 { I . .	1.06	+ 0.30	0.89	0.89	+ 0.20	0.82	1.83	+ 1.01	0.74
II . .	0.88	+ 0.57	0.63	1.15	+ 0.52	0.93	1.31	+ 0.11	0.65
III . .	0.74	+ 0.74	0.47	0.75	+ 0.28	1.16	1.46	+ 0.30	0.92
						1.91	1.22	- 0.09	0.86
						0.92	0.78	- 0.14	0.38
						1.43	1.36	- 0.07	1.06

Tabelle 2.

*Statistische Verwertung des Materials in Tab. 1 hinsichtlich Korrelation und Regression zwischen den Differenzen der 1. und 2. Messperioden.<sup>1</sup>*

	Versuchsreihe A	Versuchsreihe B
Korrelationskoeffizient (r) . . . . .	0.628	0.704
n . . . . .	18	15
t . . . . .	3.13	3.96
P . . . . .	<0.01	<0.01
Regressionskoeffizient (b) . . . . .	0.46	0.35
$b_A - b_B$ . . . . .		0.11
t . . . . .		1.684
P . . . . .		etwa 0.1

also physiologisch verschieden. Auch innerhalb der beiden Reihen sind Schwankungen von mehr als 100 % vorhanden. Wie man nach früheren Angaben erwarten kann (s. Einleitung) ist die durch CO verursachte Veränderung der Atmung von der Grösse der Normalatmung abhängig. Ist diese niedrig, bewirkt CO eine Erhöhung, im umgekehrten Falle eine Hemmung der Atmung. Abb. 1 zeigt, (als Kurve 1) die relative durch CO bewirkte Veränderung der Atmung als Funktion der Grösse der Normalatmung.

Die negativen und positiven Differenzen für die 2. Messperiode in Tabelle 1 zeigen, dass sowohl eine Erhöhung wie eine Herabsetzung der Atmung bestehen bleibt nach dem Entfernen des Kohlenoxydes. Eine statistische Behandlung zur Feststellung einer Erhöhung oder Herabsetzung der Atmung der CO-behandelten Muskeln im Verhältnis zur Kontrolle führt wegen der grossen Streuung der Werte nicht zum Ziel. Ein Vergleich zwischen der durch die CO-Behandlung verursachten nachträglichen Veränderung der Atmung mit der unmittelbar von CO hervorgerufenen zeigt indessen, dass eine Beziehung hier besteht. Sind die Differenzen der 1. Messperiode negativ, so sind die entsprechenden Differenzen der 2. Messperiode auch negativ. Liegen kleine positive Differenzen für die 1. Messperiode vor, so sind die entsprechenden negativen Zahlen der Differenzen der 2. Messperiode klein. Erst wenn grosse positive Differenzen der 1. Messperiode vorhanden sind, erscheinen auch entsprechende positive Zahlen der 2. Auch Tabelle 2 zeigt, dass eine Korrelation zwischen den Differenzen der beiden Mess-

<sup>1</sup> Die hier angegebenen Grössen sind nach BONNIER-TEDIN (1940) berechnet. Herrn Fil. Kand. S.-G. LINDBLOM danke ich für wertvolle Diskussion über die statistische Behandlung.



perioden und zwar für alle beide Versuchsreihen vorliegt. Die Werte von P zeigen die Wahrscheinlichkeit an, mit welcher die Korrelationskoeffizienten von 0 abweichen. Die entsprechenden Regressionskoeffizienten der beiden Versuchsreihen sind auch berechnet worden. Jedoch ist der gefundene Unterschied nicht gesichert.

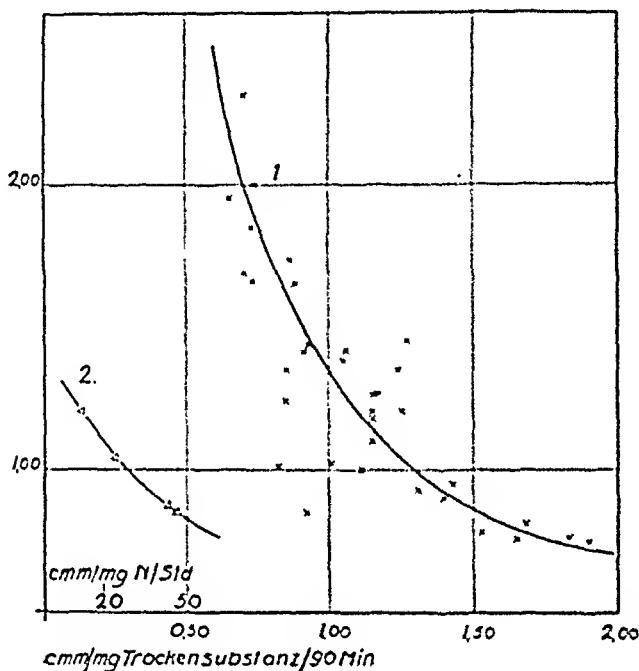


Abb. 1.  $\frac{\text{Atmung in CO}_2\text{-O}_2\text{-Gemisch}}{\text{Normalatmung}}$  als Funktion der Normalatmung.

1. Froschsartorius, 2. Seeigelembryonen (nach LINDAHL 1939).

### Diskussion.

Der Verlauf der Kurve 1 in Fig. 1 gibt keinen Anlass zu vermuten, dass CO nur bei niedriger Normalatmung erhöhend wirken sollte. Vielmehr zeigt ein Vergleich mit den Verhältnissen im Seeigelei (Kurve 2) gute Übereinstimmung. Hier liegt eine von der Grösse der Normalatmung verhältnismässig unabhängige Erhöhung der Atmung durch CO vor (LINDAHL 1939). Gleichzeitig bewirkt aber CO eine Atmungshemmung, die, in Übereinstimmung mit der Verteilungstheorie WARBURGS (1927), immer grösser wird, je grösser die Normalatmung ist.

Dass die Erhöhung der Atmung des Froschmuskels in Gegenwart von CO in einer Oxydation des Kohlenmonoxydes zu Kohlendioxyd besteht, scheint festzustehen. Die nachträgliche höhere Atmung der CO-behandelten Muskeln kann aber nicht auf diese Reaktion zurückgeführt werden. Auch wenn Spuren von CO in den Atmungsgefässen zurückgeblieben sind, können sie nicht von der Grössenordnung sein, dass sie eine Atmungserhöhung bewirken. Bei CO-Drucken niedriger als 20 % konnten FENN und COBB (1932 a) keine Erhöhung der Atmung nachweisen. Würde die ganze Menge des in der Flüssigkeit gelösten und im Muskel chemisch gebundenen COs während des Lüftens hier zurückbleiben und sich erst später auf das ganze Gefässvolumen (ca 10 ml) verteilen, so würde der CO-Druck etwa 0.5 % ausmachen. Es kann also geschlossen werden, dass eine andere Reaktion, und zwar eine Oxydation zelleigener Substanzen, die Atmungserhöhung der CO-behandelten Muskeln bedingt. Es liegt an der Hand zu vermuten, dass diese Reaktion auch in Gegenwart von CO vonstatten geht und also einen kleineren Teil des durch die Erhöhung in Erscheinung tretenden Umsatzes ausmacht.

STANNARD (1940) vertritt die Meinung, dass die durch CO bewirkte Atmungshemmung im Froschmuskel durch eine Hemmung des Keilin-Warburg-Systems zustande komme. Da die Kohlenoxydhemmung in Übereinstimmung mit der Verteilungsgleichung WARBURGS in den bisher näher untersuchten Fällen reversibel ist, scheint das Keilin-Warburg-System im Muskel andere Eigenschaften als z. B. in Hefe zu haben, oder kommt die Hemmung hier durch eine Reaktion zwischen CO und einem anderen Glied des Atmungssystems zustande. Beachtenswert ist, dass die Hemmung in der Zeit konstant bleibt, obwohl ein Teil davon nicht reversibel ist.

In welchem Masse Erhöhung und Hemmung der Atmung die erhaltenen Atmungswerte bestimmen, kann aus den vorliegenden Daten nicht geschlossen werden. Ein Vergleich zwischen der durch CO bewirkten Veränderung der Atmung in der 1. und der 2. Messperiode zeigt indessen, wie sich die CO-Wirkung verändert, wenn das CO aus den Gefässen verdrängt wird. In Versuchsreihe A, wo die Normalatmung verhältnismässig niedrig ist, finden wir durchgehend, dass die durch CO bewirkte Erhöhung der Atmung abnimmt oder in eine Herabsetzung des O<sub>2</sub>-Verbrauches übergeht. Hier ist also die Abnahme der erhöhenden Wirkung grösser als die Abnahme der hemmenden. Dasselbe gilt auch für viele Ver-

suche in Versuchsserie B. Es finden sich aber Ausnahmen, in denen eine verhältnismässig grosse Hemmung bei Entfernung des CO kleiner wird. Hier überwiegt also die Abnahme der Hemmung über die Abnahme der Erhöhung. Es handelt sich in diesen Fällen um Muskeln mit einer sehr hohen Normalatmung.

Auf Grund der grossen Streuung der erhaltenen Werte um die Regressionslinien herum kann nicht entschieden werden, ob die durch CO-Behandlung bewirkte Veränderung der Atmung in höherem Masse als die Normalatmung von dem O<sub>2</sub>-Druck abhängig ist (vgl. Tabelle 2). Auch kann der Unterschied in den Regressionskoeffizienten durch das verschiedenartige Verhalten des für die beiden Versuchsreihen benutzten Materials bedingt sein.

### Zusammenfassung.

Die durch CO hervorgerufene Erhöhung resp. Hemmung der Atmung des Froschsartorius ist nicht vollkommen reversibel. Welche der beiden Wirkungen überwiegt, hängt von der Grösse der Normalatmung ab. Für die nachträgliche Erhöhung der Atmung der CO-behandelten Muskeln kann eine Oxydation von CO zu CO<sub>2</sub> nicht verantwortlich gemacht werden.

### Literatur.

- BONNIER, G. und O. TEDIN: Biologisk variationsanalys, Stockholm 1940.  
FENN, W. O. und D. M. COBB: Amer. J. Physiol. 1932 a, 102, 379.  
—, Ibidem 1932 b, 102, 393.  
HURSH, J. B.: Ibidem. 1936, 114.  
LASER, H.: Biochem. J. 1937, 31, 1671.  
LINDAHL, P. E.: Z. vergl. Physiol. 1939, 27, 136.  
SCHMITT, F. O. und M. G. SCOTT: Amer. J. Physiol. 1934, 107, 85.  
STANNARD, J. N.: Ibidem 1940, 129, 195.  
WARBURG, O.: Biochem. Z. 1927, 189, 354.
-

## De l'action de la thyroxine et du dinitrophénol sur la consommation d'oxygène chez des tétards normaux et chez des tétards narcotisés.

Par

JOHAN MÄRTENSSON.

Reçu le 18 mars 1942.

---

La question de savoir en quelle mesure la thyroxine (thyr.) agit sur la consommation d'oxygène chez les animaux à sang froid à été prise comme argument dans la discussion du problème du point d'attaque de la thyr. On sait, depuis les recherches de GUDERNATSCH que l'extrait de glande thyroïde ou thyroxine est susceptible de provoquer ou de hâter la métamorphose de certains animaux à sang froid. Selon ROMEIS (1923), il se produit alors chez les tétards une augmentation du métabolisme et cette augmentation est proportionnelle à la quantité de thyr. apportée. NAGEL (1927) rapporte la même chose au sujet de l'axolotl. Plusieurs auteurs ont en outre constaté une augmentation des processus d'oxydation consécutive à un apport de thyr. dans des expériences in vitro même avec des tissus provenant d'animaux à sang froid (AHLGREN 1925, v. EULER 1932, MANSFELD 1935, HAARMANN 1936). D'un autre côté, plusieurs autres auteurs nient que la thyr. soit susceptible d'augmenter le métabolisme chez les animaux à sang froid: ABELIN et SCHEINFINKEL (1923) au sujet de tétards: ABDERHALDEN et WERTHEIMER (1928), HENSCHEL et STEUBER (1931) au sujet de grenouilles. DREXLER et v. ISSEKUTZ jun. (1935) traitrent à la thyr. une série d'animaux à sang froid avec un résultat négatif. VON ISSEKUTZ (1935) place le point d'action de la thyr. dans les mécanismes régulateurs centraux, avant tout dans

le centre thermorégulateur qui manque chez les animaux à sang froid. Il soutient que ceux-ci ne sont nullement sensibles à la thy. et s'opposent ainsi aux animaux à sang chaud pour ce qui est de l'action de la thy. sur la consommation d'oxygène.

Il est clairement démontré que le dinitrophénol (dnph.) a son point d'action sur les cellules, donc dans des mécanismes qui sont communs aux animaux à sang chaud et aux animaux à sang froid. (MAGNE, MAYER et PLANTEFOL 1932, EHRENFEST et RONZONI 1933 de même que DE MEIO et BARRON 1934). — Par contre le dnph. n'a aucune influence sur la métamorphose des têtards (CUTTING et TAINTER 1932), observation confirmée par ALOISI (1939).

ALWALL (1935) a révélé l'existence d'un synergisme entre la thy. et le dnph. pour ce qui est de leur action sur la consommation d'oxygène chez les lapins: l'action stimulante d'une dose donnée de dnph. est sensiblement plus forte si l'animal a été au préalable traité à la thy. Presque simultanément GLAUBACH et PICK (1934) avaient constaté le même synergisme au sujet de l'accroissement de température et de la toxicité, sans toutefois donner d'analyse plus détaillée du processus. Plus tard, ALWALL et SCHEFF-PFEIFER (1937) ont obtenu les mêmes résultats au cours d'expériences de perfusion avec des pattes de chien survivantes.

Comme preuve du point d'attaque central de la thy., v. ISSEKUTZ (1935) souligne que l'action stimulante sur le métabolisme chez les mammifères est supprimée si on donne à l'animal une forte dose de narcotique. Plus tard MANSFELD, TYUKODY et SCHEFF-PFEIFER (1936) ont cependant montré que des narcotiques à forte dose suppriment cette action de la thy. même après une section de la moëlle cervicale, ce qui prouve donc une action périphérique. ALWALL et SYLVAN (1937, 1939), expérimentant avec des lapins, pourraient montrer que le synergisme dnph.-thy. est supprimé par l'uréthane, mais seulement après l'administration d'une très forte dose du produit.

Le but du travail dont nous présentons ici les résultats a été d'examiner si on peut avec la thy. augmenter la consommation d'oxygène chez des têtards et obtenir chez ceux-ci la même intensification d'action du dnph. que chez les animaux à sang chaud. Nous avons aussi examiné si on peut au moyen de narcotiques neutraliser un éventuel synergisme.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Résultats déjà en partie présentés au Ve congrès Nordique de physiologie (MÅRTENSSON 1937).

## Méthode.

Nous avons employé pour nos expériences des têtards de *Rana temporaria*, l'espèce qui réagit le plus nettement à un traitement à la thyroïde (ROMEIS 1923). Les animaux furent tous récoltés au même lieu naturel d'éclosion et furent ensuite gardés dans les mêmes conditions. Ils étaient en général d'une longueur totale de 22 à 25 mm. Les embryons de pattes de derrière commençaient à se montrer comme de petites excroissances non différenciées. Pour chaque série d'expériences il fut choisi autant que possible des animaux de même taille et de même degré de développement. — Dans la plupart des expériences précédentes qui avaient pour objet une comparaison aussi avec des substances non liposolubles, entre autres le bleu de méthylène, les têtards avaient été auparavant traités avec une solution de cyclamine qui a pour effet de détacher l'épithélium superficiel, si bien que la peau devient perméable aux cristalloïdes qui autrement ne peuvent la traverser. Pour ce qui est du détail de cette méthode qui a été indiquée par OVERTON, nous renvoyons aux travaux de celui-ci (1913, 1918) et à MÄRTENSSON (1936). — La mesure de la consommation d'oxygène fut effectuée au microrespiromètre selon la méthode de Warburg. Les récipients furent remplis de 3.0 ml de solution saline (composition: 0.55 % de NaCl, 0.03 % de CaCl<sub>2</sub> et 0.02 % de KCl), solution dans laquelle les bêtes furent placées. La température fut maintenue à 22°. Le récipient fut agité avec une force aussi grande que possible (fréquence 100/min., amplitude  $\pm 20$  mm), sans que la solution d'hydrate de potassium nécessaire à l'absorption de l'acide carbonique ne jaillisse au dehors. Il est évidemment de la plus grande importance, au cours d'expériences de ce genre sur le métabolisme, où les animaux d'expérience doivent prendre leur oxygène dans le liquide en suspension, que celui-ci soit, pendant toute la durée de l'expérience saturé d'oxygène. Pour cela nous avons employé de l'oxygène pur dans les respiromètres.

En règle générale, nous avons placé deux têtards dans chaque récipient. Nous les avons pesés au moyen d'une balance à torsion (dans un plateau perforé, si bien que le liquide en suspension pouvait s'écouler complètement) et n'avons toléré, entre les sujets d'une même série d'expériences que des différences de poids insignifiantes. — Après une période de stabilisation de 7 à 10 minutes, nous avons noté la consommation d'oxygène pendant des périodes de 30 minutes. En général les expériences ont duré de 2 heures  $\frac{1}{2}$  à 3 heures. De la consommation totale d'oxygène pendant tout le cours de l'expérience nous avons déduit la consommation par gramme de têtard et heure et nous avons compté l'accroissement éventuel en pourcentage de la consommation d'oxygène des sujets de contrôle.

## Action du dinitrophénol sur des têtards.

Étant donné que le dnph., en tant que corps liposoluble, traverse l'épithélium superficiel des têtards sans qu'on ait besoin de faire

subir à ces derniers aucun traitement et que son action se manifeste rapidement, nous l'avons, pendant les expériences de Warburg, tout simplement ajouté au liquide dans le récipient du respiromètre. Nous avons employé pour les expériences du *dinitrophénol* 1—2—4 cc (indicateur de Kahlbaum).

Au cours de quelques expériences préparatoires nous avons examiné la toxicité du dnph. A concentration moyenne le produit provoqué une augmentation de la fréquence et du débit du pouls de même qu'une intensification des mouvements respiratoires (observés au microscope). Les animaux deviennent très vifs et nerveux. Ensuite le rythme du cœur se fait irrégulier et lent, les animaux deviennent apathiques et la plupart du temps ne réagissent plus et la circulation finit par cesser complètement. Cette phase de paralysie se produit presque immédiatement à plus fortes concentrations. Après quelques mouvements désordonnés et spasmodiques les bêtes deviennent alors raides comme des bouts de bois.

Comme on peut s'y attendre, la sensibilité est encore plus grande chez les sujets traités à la cyclamine, puisque le dnph. pénètre plus rapidement chez eux et atteint plus facilement une concentration toxique dans leur organisme. Une concentration de  $5.10^{-6}$  de dnph. tue des tétards traités à la cyclamine en 40 minutes à peu près, tandis que les sujets non soumis à ce traitement vivent 2 heures  $\frac{1}{2}$  environ. Ceci dans une atmosphère normale et sans mouvement d'agitation du récipient. Dans une atmosphère d'oxygène et dans un récipient soumis à une forte agitation, les sujets traités à la cyclamine peuvent être très vivaces encore après 3 heures passées dans la même solution de dnph. L'apport d'oxygène a donc ici le même effet sur la toxicité que celui révélé par TAINTER (1934) pour des rats et des cobayes et par ALWALL (1935) pour des lapins.

Table 1.

*Accroissement en % de la consommation d'oxygène  
au moyen du dinitrophénol.*

Concentration de dnph.	Tétards traités à la cyclamine.	Tétards non traités à la cyclam.
$1.10^{-5}$	—	108 % (2)
$5.10^{-6}$	116 % (6)	61 % (5)
$2.10^{-6}$	79 % (10)	25 % (2)
$1.10^{-6}$	46 % (10)	0 % (1)
$5.10^{-7}$	19 % (8)	—
$2.10^{-7}$	2 % (1)	—

Dans la table 1, nous donnons l'augmentation procentuelle de la consommation d'oxygène pendant des expériences avec différentes concentrations de dnph. (Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de série d'expériences, dont le chiffre de pourcentage est la moyenne).

Dans ces conditions d'expérience on peut donc augmenter la consommation d'oxygène chez des tétards jusqu'à un maximum d'environ deux fois la valeur normale.

Nous avons aussi opéré quelques expériences parallèles avec du bleu de méthylène (*Methylenblau Medicinale Merck*) dont l'action stimulante sur la consommation d'oxygène est de même augmentée par un apport préalable de thyr. (ALWALL et SCHEFF-PFEIFER 1937). Le bleu de méthylène ne pénètre pas dans des sujets non traités et ceux-ci peuvent, sans inconvénient vivre plusieurs jours dans une concentration aussi forte que  $1.10^{-4}$ . Par contre ce même produit pénètre rapidement dans des sujets traités à la cyclamine. Une concentration de  $1.10^{-4}$  entraîne la mort en un temps d'1 heure—1 heure  $\frac{1}{2}$ . Mais la concentration du bleu de méthylène devient plus forte dans l'organisme de l'animal, tandis que le liquide environnant se décolore. Il n'y a donc pas équilibre entre la concentration à l'intérieur des animaux et la concentration à l'extérieur, comme c'est le cas pour le dnph., et les expériences ne sont pas comparables. Cependant la consommation d'oxygène augmente, mais l'augmentation ne dépasse pas un maximum de 35 %.

### Consommation d'oxygène chez des tétards traités à la thyroxine.

Nos expériences n'ont visé qu'à établir une augmentation éventuelle de la consommation d'oxygène après un apport de thyr., non pas à préciser les conditions quantitatives du phénomène. Au début nous avons introduit la thyr. dans le corps des bêtes en leur donnant à manger de la glande thyroïde séchée et finement pulvérisée (*Glandulae thyreoid. sicc. Schering*) à proportion de 50 mg pour 100 ml. d'eau. Les sujets de contrôle furent placés pendant le même temps dans 100 ml d'eau contenant 50 mg de sang séché et pulvérisé. On avait en effet constaté qu'un simple apport de nourriture, même en quantités aussi petites qu'ici, exerce une influence essentielle sur la consommation d'oxygène, si celle-ci est mesurée peu de temps après la consommation. Dans des expériences ultérieures, nous avons mis 2 mg de thyroxine (*Thyroxin cryst. synth. Roche*), au préalable dissouts dans quelques gouttes d'hydrate de soude, dans 100 ml d'eau, obtenant ainsi une concentration de 1 : 50,000 qui permet une absorption pérorale de la thyr. en quan-



tité suffisante. — Comme on sait, la thy. n'agit qu'après un certain temps de latence. Après l'apport de la substance thyroïde, on pouvait observer un effet net déjà au bout de 9 heures (voir expérience 3, table 2); après l'introduction de thyroxine, l'effet commença à se faire sentir après 24 heures. En général on a poussé le temps d'action jusqu'au delà de 40 heures avant de mesurer la consommation d'oxygène. Au bout de ce temps-là on n'a pas pu constater d'influence nette sur la métamorphose.

Dans des expériences effectuées après un temps de latence de longueur convenable l'augmentation de la consommation d'oxygène a été, dans deux cas et après apport de thyroïde, de 22 et 39 % et, dans cinq expériences avec de la thyroxine, de 26, 24, 42, 20 et 34 %, soit en moyenne 30 % de la consommation d'oxygène des animaux de contrôle.

### Action combinée du dinitrophénol et de la thyroxine sur la consommation d'oxygène chez des têtards.

La table 2 rend compte de quelques expériences sur la consommation d'oxygène chez des têtards sous l'influence du dnph. seulement, de la thy. seulement et de la même concentration de dnph. et de thy. en même temps. La consommation d'oxygène est indiquée en mm<sup>3</sup> par gramme de têtard et par heure de même que l'augmentation en % de la consommation des animaux de contrôle.

Table 2.

*Consommation d'oxygène chez des têtards sous l'action du dinitrophénol et de la thyroxine.*

Concentration de dnph.	Animaux de contrôle O <sub>2</sub> mm <sup>3</sup>	Dnph.		Thyr.		Dnph. + Thyr.	
		O <sub>2</sub> mm <sup>3</sup>	Augmentation %	O <sub>2</sub> mm <sup>3</sup>	Augmentation %	O <sub>2</sub> mm <sup>3</sup>	Augmentation %
1.10 <sup>-6</sup>	9.5	11.6	22	11.6	22	17.3	81
2.10 <sup>-6</sup>	9.6	14.5	50	13.3	39	25.0	159
5.10 <sup>-6</sup>	22.3	36.5	60	25.6	12	49.2	116
5.10 <sup>-6</sup>	20.5	33.7	65	24.5	20	46.8	126
5.10 <sup>-6</sup>	18.6	30.9	66	25.0	34	56.2	207

Les deux premières expériences ont été effectuées avec des têtards traités à la cyclamine, les trois dernières avec des têtards non traités, d'où la différence dans la consommation d'oxygène.

Chez les sujets traités à la thyrr., le dnph. donne une augmentation de la consommation d'oxygène qui dépasse en une telle mesure la somme de l'augmentation due à la thyrr. et au dnph. séparément que l'on peut parler de synergisme. Le «suraccroissement» dû au synergisme est, compté en pourcentage de la consommation des animaux de contrôle, 37, 70, 44, 41 et 107 %, pour ce qui est des expériences reproduites ici. Si on évalue cette augmentation en pourcentage de l'effet réuni des produits pris séparément, on obtient les valeurs de 84, 79, 61, 48 et 107 %.

Dans la dernière des expériences reproduites le minimum de la consommation absolue d'oxygène dans le groupe d'animaux de contrôle était de 7.6 mm<sup>3</sup>, le maximum étant, pour le groupe dnph. + thyrr. 20.9 mm<sup>3</sup>. Dans le dernier cas on demande donc plus au transport d'oxygène de l'atmosphère gazeuse aux tissus des sujets à travers le liquide. Il est vraisemblable que la possibilité physique de ce transport constitue un facteur qui limite l'augmentation de la consommation d'oxygène. C'est pourquoi on ne peut pas s'attendre ici à un accroissement aussi fort que chez les mammifères. Qu'il en soit bien ainsi, c'est ce qui ressort de l'expérience suivante qui montre clairement l'importance de l'atmosphère d'oxygène pour qu'un besoin d'oxygène augmenté par des pharmaca puisse être satisfait dans les conditions d'expérience données: consommation d'oxygène chez les animaux de contrôle avec de l'air dans le récipient du respiromètre: 52.7 mm<sup>3</sup>, avec de l'oxygène: 55.2 mm<sup>3</sup>, donc seulement 5 % de plus environ. Sous l'action du dnph. sur les animaux traités à la thyrr. la consommation d'oxygène dans l'air fut de 80.5 mm<sup>3</sup> et dans l'oxygène 121.2 mm<sup>3</sup>, donc 50 % de plus.

Les résultats de ces expériences autorisent à conclure *qu'il existe un synergisme entre la thyroxine et le dinitrophénol quant à l'action de ces produits sur la consommation d'oxygène chez des tétards et qu'en principe ces animaux à sang froid ne se distinguent pas, à ce point de vue, des animaux à sang chaud.*

### Action du dinitrophénol et de la thyroxine sur des tétards narcotisés à l'uréthane.

La concentration narcotique limite de l'uréthane est pour les tétards 0.037—0.045 mol., soit environ 0.36 % (OVERTON 1901). Dans les expériences rapportées ici, nous avons employé de l'uréthane à une concentration de 0.5—1.0 %. Dans de telles solutions les tétards s'endorment en un temps variant de 6 à 3 minutes. — Pendant la narcose la consommation d'oxygène baisse fortement. Dans une expérience avec 0.5 % d'uréthane, elle tomba de 41.6 à 23.5 mm<sup>3</sup>, soit de 43 %; dans une autre effectuée avec 1 % elle

tomba de 51.1 à 22.6 mm<sup>3</sup>, soit 56 %. (Nous n'avons malheureusement pas mesuré la consommation d'oxygène juste à la concentration limite, ce qui aurait pu être d'un certain intérêt.)

*L'action du dinitrophénol sur la consommation d'oxygène n'est pas entravée par la narcose* mais au contraire se manifeste relativement plus fortement que chez les animaux éveillés, comme il ressort de l'expérience suivante:

	Animaux de contrôle	Animaux sous l'action du dinitrophénol	Accroissement
Sans narcose . . . . .	17.0 mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>	27.1 mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>	59 %
Par narcose . . . . .	7.5 mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>	14.6 mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>	94 %

La forte action du dnph. doit en partie s'expliquer par le fait que les conditions d'accroissement sont plus favorables, puisque la consommation absolue d'oxygène même sous l'action du dnph. est plus petite que chez les animaux de contrôle sans dnph.

Il ressort de la table 3 comment la consommation d'oxygène chez les têtards narcotisés est influencée par le dnph., par la thy. et par la même concentration de dnph. et de thy. en même temps. Le temps pendant lequel les animaux ont été soumis à l'action de a thyroxine a, dans nos expériences, varié entre 41 et 49 heures.

Table 3.

*Consommation d'oxygène chez des têtards narcotisés sous l'action du dinitrophénol et de la thyroxine.*

Concentration d'uréthane	Animaux de contrôle O <sub>2</sub> mm <sup>3</sup>	Dnph.		Thyr.		Dnph. + Thyr.	
		O <sub>2</sub> mm <sup>3</sup>	Aug- menta- tion %	O <sub>2</sub> mm <sup>3</sup>	Aug- menta- tion %	O <sub>2</sub> mm <sup>3</sup>	Aug- menta- tion %
0.5 %	9.4	25.7	174	13.3	42	33.9	260
0.5 %	9.9	21.6	127	11.8	24	23.8	150
1.0 %	10.9	23.1	131	10.6	6	25.8	158
1.0 %	10.2	23.9	134	11.2	10	30.5	199

Ce surcroît d'augmentation, qui dans ces expériences est dû au synergisme, est de 44,0, 21 et 55 %. Il peut donc parfois se produire un certain synergisme même par profonde narcose. Mais si l'on compte le surcroît en pourcentage de l'effet réuni du dnph. et de la thy. pris séparément, les chiffres sont considérablement plus bas que pour les animaux non narcotisés: 20,0, 15 et 38 % (soit

en moyenne 18 % contre 76 % pour les expériences reproduites dans la table 2).

*Par profonde narcose à l'uréthane, le synergisme dinitrophénol-thyroxine est donc supprimé ou fortement affaibli. En cela les tétards ne se distinguent pas non plus des animaux à sang chaud.*

### Résumé.

Dans la discussion sur le point d'attaque de l'effet promoteur du métabolisme de la thyroxine, on a soutenu que celle-ci agissait sur les mécanismes régulateurs centraux, mécanismes qui font défaut chez les animaux à sang froid, sur la consommation d'oxygène de qui la thyroxine n'aurait, en conséquence, aucun effet.

Les expériences présentées ci-dessus, où la consommation d'oxygène chez des tétards a été mesurée selon la méthode de Warburg, ont cependant donné les résultats suivants:

*Le dinitrophénol peut augmenter la consommation d'oxygène chez des tétards jusqu'à un maximum de 2 fois la consommation normale. La thyroxine produit un accroissement d'environ 30 %. Si on traite au dinitrophénol des tétards au préalable traités à la thyroxine, l'accroissement de la consommation d'oxygène devient sensiblement plus grand que la somme de l'effet des corps pris séparément. Ce synergisme est supprimé ou affaibli par une profonde narcose produite par de l'uréthane, tandis que l'action du dinitrophénol subsiste.*

Aux points de vue examinés ici, les tétards réagissent de la même façon que les animaux à sang chaud. On ne peut donc pas parler de différence de principe entre ceux-ci et ceux-là pour ce qui est de leur comportement envers la thyroxine.

### Références bibliographiques.

- ABDERHALDEN, E. et E. WERTHEIMER: Pflüg. Arch. ges. Physiol. 1928, 219, 588.  
 ABELIN, I. et N. SCHEINFINKEL: Ibid. 1923, 198, 151.  
 AHLGREN, G.: Skand. Arch. Physiol. 1925, 47, Suppl. 1.  
 ALOISI, M.: Boll. Soc. ital. biol. sper. 1939, 14, 638 (cité d'après Ber. ges. Physiol. 1940, 118, 30).  
 ALWALL, N.: Skand. Arch. Physiol. 1935, 72, Suppl.  
 ALWALL, N. et I. SCHEFF-PFEIFER: Arch. exp. Path. Pharmak. 1937, 184, 296.  
 ALWALL, N. et S. SYLVAN: Skand. Arch. Physiol. 1937, 77, 5.  
 —, Acta med. scand. 1939, 101, 290.

- CUTTING, W. C. et M. L. TAINTER: Proc. soc. exp. biol. N. Y. 1932, 31, 97.
- DREXLER, E. et B. v. ISSEKUTZ jun.: Arch. exp. Path. Pharmac. 1935, 177, 435.
- EHRENFEST, E. et E. RONZONI: Proc. soc. exp. biol. N. Y. 1933, 31, 318.
- EULER, U. v.: Arch. int. Pharmacodyn. 1932, 42, 278.
- GLAUBACH, S. et E. P. PICK: Schweiz. med. Wschr. 1934, 64, 115.
- HAARMANN, W.: Arch. exp. Path. Pharmac. 1936, 180, 167.
- HENSCHEL, H. et M. STEUBER: Ibid. 1931, 160, 401.
- ISSEKUTZ, B. v., Wien. klin. Wschr. 1935, 48, 1325.
- MAGNE, H., A. MAYER et H. PLANTEFOL: Ann. physiol. Physicochim. biol. 1932, 8, 1.
- MANSFELD, G.: Klin. Wschr. 1935, 14, 884.
- MANSFELD, G., F. v. TYUKODY, et I. SCHEFF-PFEIFER: Arch. exp. Path. Pharmac. 1936, 181, 376.
- MEIO, R. H. DE et E. S. G. BARRON: Proc. soc. exp. biol. N. Y. 1934, 32, 36.
- MÅRTENSSON, J.: Skand. Arch. Physiol. 1936, 74, 281; 1937, 77, 59.
- NAGEL, A., Arch. exp. Path. Pharmac. 1927, 120, 1.
- OVERTON, E.: Studien über die Narkose, Jena 1901.
- , Lunds Univ. Årsskrift 1913, N. F. Avd. 2, 9, nr. 7; 1918, N. F. Avd. 2, 14, nr. 7.
- ROMEIS, B.: Handb. Biol. Arb. Meth. 1923, V: 3, A, 491.
- TAINTER, M. L.: J. Pharmacol. 1934, 51, 45.
-

ACTA PHYSIOLOGICA SCANDINAVICA

VOL. 3 SUPPLEMENTUM IX.

Aus der biophysikalischen Abteilung des Wenner-Gren-Institutes  
der Universität, Stockholm.

---

# ÜBER DIE PRIMÄRVORGÄNGE BEI CHEMOZEPTORENBEEINFLUSSUNG

*Eine physikalisch-chemische Übersicht.*

*Einige experimentelle Beiträge.*

*Versuch einer Theorie.*

*von*

GÖSTA EHRENSVÄRD

---

STOCKHOLM 1942



# INHALTSVERZEICHNIS.

	Seite
I. <i>Einführung</i> .....	9
II. <i>Die Prinzipien der Betrachtungsweise und das zugängliche Tatsachenmaterial</i> .....	13
a. Allgemeines .....	13
b. Zur Frage der Spezifität .....	18
c. Distributionsfaktoren .....	22
III. <i>Betrachtungen über die innere Struktur physiologisch wirk- samer Verbindungen</i> .....	26
a. Allgemeines .....	26
b. Substituenteneinfluss und Elektronenverteilung .....	28
c. Austausch von Ringstrukturen .....	34
d. Austausch einzelner Gruppen .....	42
e. Alkylgruppen und Raumstrukturfaktoren .....	49
f. Die Möglichkeiten für eine Raumstrukturanalyse ....	52
IV. <i>Einige experimentelle Untersuchungen der elektrischen Er- scheinungen in flüssigen Zwischenflächen</i> .....	56
a. Über Zwischenflächenstruktur .....	56
b. Über Zwischenflächenpotentiale .....	59
1. Der Einfluss anorganischer Elektrolyte .....	66
2. Der Jodeffekt .....	76
3. Einfluss von Alkoholen .....	80
4. Einfluss von einigen Kohlenwasserstoffen .....	98
5. Einfluss von Ketonen und Aldehyden .....	99
6. Einfluss von Aminen .....	100
7. Einfluss der Konstitution der organischen Phase auf die von organischen Stoffen bewirkten Grenz- flächenpotentialänderungen .....	101
8. Erscheinungen der Spezifitätshemmung .....	105
c. Die Beziehung der Phasengrenzpotentiale zu physiolo- gischen Systemen .....	106



	Seite
V. <i>Versuch einer Theorie des primären Riechmechanismus</i> . . . .	111
a. Eine Einteilung der Riechstoffe . . . . .	111
b. Eine physikalisch-chemische Deutung des Rezeptions- vorganges . . . . .	122
1. Geeignete bioelektrische Systeme . . . . .	123
2. Der Bau des Rezeptorensystems . . . . .	124
3. Der adequate Reiz . . . . .	126
4. Die Aktionsauslösung . . . . .	127
c. Diskussion über Reizintensität und Reizqualität . . . .	134
VI. <i>Zusammenfassung</i> . . . . .	143
VII. <i>Appendix</i> . . . . .	143
a. Einzelheiten der Messmethodik . . . . .	143
b. Synthese einiger organischen Verbindungen . . . . .	147
c. Literaturverzeichnis . . . . .	148

---

## VORWORT.

Das ursprüngliche Ziel der vorliegenden Arbeit war, die physikalisch-chemischen Grundlagen der Geruchs- und Geschmackswirkungen näher zu untersuchen. Der Arbeitsplan wurde folgendermassen entworfen: erstens sollte ein Versuch gemacht werden, für die allgemeinen Prinzipien, nach denen der Geruchs- und der Geschmackssinn organische Verbindungen klassifizieren, einige Anhaltspunkte zu erlangen. Zweitens sollten auf physikalisch-chemischer Basis die Richtlinien für eine annehmbare Theorie der chemischen Beeinflussung der Chemozeptoren festgelegt werden. Die erworbenen Resultate sollten später die Unterlage für eine direkte sinnesphysiologische Untersuchung bilden.

Gleich von Anfang an (1935) war es ziemlich klar, dass derselbe grosse Komplex von Fragen, der hier bearbeitet werden musste, auch bei der Untersuchung der *Einwirkung organischer Verbindungen auf physiologische Systeme im allgemeinen* zu behandeln sein würde. Im weiteren Verlauf der Auslese verschiedener Strukturfaktoren der Riech- und Geschmackstoffe wurde Verfasser dieser Arbeit in seiner Auffassung bestärkt, dass die primäre Chemozeptorenwirkung als eine ganz spezielle Erscheinung einer allgemeinen physiologischen »Analyse« anzusehen sei. Es war ja auch zu erwarten, dass die Prinzipien des Einflusses der Molekularstruktur auf die Geruchs- und Geschmackswirkung in modifizierter Form in anderen physiologischen Systemen wiederzufinden sein würden. Die Überlegungen führten somit ziemlich früh zu dem alten Problem des allgemeinen Zusammenhanges zwischen Molekularbau und physiologischer Wirkung.

Eines der wichtigsten Teilprobleme dieses äusserst unzugänglichen Gebietes ist die Frage der spezifischen Verankerung niedermolekularer Stoffe an hochmolekulare Komponenten verschiedener physiologischer Systeme. Es liegt nahe, die primäre Einwirkung der Riech- und Geschmackstoffe mit dieser Frage in Zusammenhang zu bringen. Um eine direkte Untersuchung *in vivo* vorbereiten zu können, wurde daher die ganze Arbeit auf die spezifische Adsorption organischer Verbindungen eingestellt. Die Vermutung, dass spezifische Erscheinungen bei der Einwirkung verschiedener Verbindungen auf Zwischenflächenstrukturen auftreten könnten, führte zu einer experimentellen Untersuchung der elektrischen Erscheinungen in der Übergangszone zwischen organischen Flüssigkeiten und Wasserlösungen. Aus den gewonnenen Resultaten wurde schliesslich eine Theorie des primären Riechmechanismus entwickelt.

Ich hätte mich natürlich hier auf eine kurze Besprechung der experimentellen Resultate und der Möglichkeiten der untersuchten Systeme, als Modelle für das bioelektrische System des Geruchssinnes zu dienen, beschränken können. Die theoretische Vorbereitung der Problemstellung, die an sich eine ziemlich ausgiebige Behandlung angeschlossener physikalischer, chemischer und physiologischer Fragen erfordert, ist jedoch hier absichtlich zu einer allgemeineren Übersicht über verschiedene Strukturfaktoren physiologisch wirksamer Verbindungen erweitert worden. Der Nachteil dieser Aufstellung ist der, dass der Zusammenhang zwischen dem theoretischen und dem experimentellen Teil weniger prägnant erscheint. Ein gewisser Vorteil hierbei ist jedoch, dass der erste Teil der Arbeit — allerdings in sehr konzentrierter Form — eine zusammenhängende Besprechung eines der schwierigsten Probleme der physiologischen Chemie darstellt. Selbstverständlich macht dieser allgemeine Überblick keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Die Betrachtungen an sich über die physikalisch-chemische Struktur physiologisch wirksamer Verbindungen sind durchweg keineswegs gänzlich neuartig und originell, sondern sind eigentlich eine Zusammenfassung von Gedanken

und Vorstellungen, die bei jedem physikalisch-chemisch orientierten Physiologen mehr oder weniger latent liegen. Jedoch könnte eine derartige Zusammenstellung vielleicht in der bisher auf diesem Gebiete sehr lückenhaften Literatur ihren Platz finden.

Gegen den experimentellen Teil können die Einwände gemacht werden, dass das bearbeitete Material im Verhältnis zu den daraus gezogenen Schlussfolgerungen zu dürftig sei. Die angeführten Experimente sind aber nur eine Auswahl von typischen Erscheinungen aus einem Gebiete, das in Bezug auf aufzuarbeitendes Material nahezu unerschöpflich ist. Ich bin mir auch der Verantwortlichkeit bewusst, in manchen Fällen — besonders bei der Aufstellung von Theorien über den primären Riechmechanismus — vielleicht etwas zu kühne Schlussfolgerungen gezogen zu haben. Doch könnten vielleicht gewisse Gedankengänge darin anderen Kollegen, die in dieses Neuland einzudringen versuchen, zur Anregung dienen.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, an dieser Stelle meinem verehrten Lehrer, Prof. Dr. J. RUNNSTRÖM, Chef des Wenner-Gren-Institutes für experimentelle Biologie der Universität Stockholm für seine unermüdliche Unterstützung aller Art aufrichtig zu danken. Prof. Dr. E. HULTHÉN und Prof. Dr. O. KLEIN bin ich für wertvolle Ratschläge, physikalische Probleme betreffend, ebenfalls sehr dankbar. Weiter denke ich gern an das anregende experimentelle Zusammenarbeiten mit meinen Kollegen Dozent L. G. SILLÉN, Dozent M. KARSCHULIN (Zagreb) und Dr. D. F. CHEESMAN, sowie an die unzähligen Diskussionen mit Kollegen aus den verschiedensten Gebieten der Physik, Chemie und Physiologie. Besonders möchte ich hier Dozent P. E. LINDAHL, die Lizentiaten K. BRANDT und N. SVARTHOLM, Mag. N. LÖFGREN und Ing. C. VON SIVERS erwähnen. Schliesslich bin ich meinen früheren und jetzigen Assistenten, vor allem meiner Frau und Kollegin, den grössten Dank schuldig. Die sprachliche Verbesserung des Manuskriptes verdanke ich Frl. I. FRANKENSTEIN.

Die Wenner-Gren-Stiftung hat meine Arbeit während der letzten Jahre grosszügig unterstützt, wofür ich meinen besonderen Dank ausspreche.

Stockholm, 27. 12. 1941.

---

## Einführung.

Auf dem Gebiet der Physiologie, dem u. a. die Chemotherapie zugehört, bildet die Frage nach dem Zusammenhang zwischen chemischer Struktur und physiologischer Wirkung das Hauptproblem. Hier hat sich bei dem schrittweisen Eindringen die enorme Komplexität dieses Problems gezeigt. Jeder chemische Eingriff in ein physiologisches System bedeutet die Störung des dynamischen Gleichgewichtes einer chemischen Organisation, die auf einer feingeschliffenen Zusammenarbeit verschiedenster Wirkstoffe basiert. Der Typus und die Geschwindigkeit der einzelnen Reaktionsabläufe, wie sie im Rahmen der verschiedenen Reaktionsketten festgelegt sind, sind für die speziellen Eigenschaften des Systems ausschlaggebend. Ein chemisches Eingreifen in einzelne oder mehrere Teilvorgänge wird charakteristische Veränderungen im System als Ganzem auslösen, Veränderungen, die sich als *a l l g e m e i n e p h y s i o l o g i s c h e R e a k t i o n e n* äussern. Die Aufgabe des chemisch orientierten Physiologen, diese allgemeinen Reaktionen — mag es sich um Störungen der Zellteilungsvorgänge, des Zellstoffwechsels, der Sekretionsvorgänge oder der bioelektrischen Erscheinungen handeln — auf eine bestimmte Teilreaktion der chemischen Organisation zurückzuführen, ist eine überaus schwierige. Es handelt sich hier darum, den primären Angriffspunkt im physiologischen System zu lokalisieren, wozu eine Methodik erforderlich ist, die eine Untersuchung des betreffenden Systems *in vivo* oder unter möglichst physiologischen Bedingungen gestattet. Das bis jetzt erreichte Resultat dieser Lokalisierungsarbeit ist noch nicht ausreichend, um eine allgemeinere, physiologische Basis für die Fragestellung, *wie* sich die primäre Einwirkung vollzieht, zu bieten. Diese Frage nach der inneren Natur des Einwirkungsmechanismus ist ein rein physikalisch-chemisches Problem. Die Versuche einer quantitativen Behandlung der Energetik einer chemischen

Allgemeine  
Gesichts-  
punkte.

Beeinflussung einzelner Biokatalysatorreaktionen basieren hauptsächlich auf *in vitro*-Versuchen mit den aus dem physiologischen Zusammenhang herausgegriffenen — möglichst rein dargestellten — Systemen. Diese Arbeitsweise schliesst ein allmähliches Abstrahieren der biologischen Seite des Problems in sich und strebt nach einer einheitlichen *energetischen* Auffassung der Biokatalysatoren und deren chemischer Beeinflussung. Für einen physikalischen Chemiker bedeutet der mehr oder weniger selektive Einfluss eines chemischen Stoffes auf verschiedene Biokatalysator-Reaktionen einen Hinweis auf gemeinsame Grundlagen jener Erscheinungen und die gegenseitige Feinabstimmung der betreffenden Biokatalysatoren ihren speziellen Substraten gegenüber. Die Parallelen aus der nicht-biologischen Katalyse sind schliesslich für den physikalischen Chemiker eine Veranlassung, die Untersuchungen über das Problem: chemische Struktur-physiologische Wirkung präliminär in das Gebiet der allgemeinen spezifischen Erscheinungen, wie sie hauptsächlich in heterogenen Systemen auftreten, zu verlegen. Die sehr unklaren Vorstellungen von den Vorgängen auf diesem Gebiet erschweren sowohl den Angriff der physikalisch-chemischen Seite des Problems als auch den der physiologischen.

Es ist also nicht verwunderlich, dass der gegenwärtige Status der Chemotherapie insbesondere recht eigentümlich ist. Das physiologische und chemische Tatsachenmaterial ist in den letzten Jahren infolge der systematischen Durchprüfung der physiologischen Wirkung unendlich vieler Reihen organischer Verbindungen riesenhaft angewachsen. Das systematische Suchen nach Schutzmitteln, vor Allem gegen pathogene Organismen, führt zu der Entdeckung zahlloser Homologe und Derivate biochemisch wichtiger Stoffe, die in *in vivo*- oder *in vitro*-Versuchen nach der Intensität ihrer allgemein-physiologischen Wirkungen klassifiziert werden. Jedoch ist die Kenntnis der Art des Eingreifens dieser Stoffe im Allgemeinen sehr gering. In gewissen Fällen hat man durch chemisch-physiologische Erforschung einer Substanz die Feststellung gemacht, dass eine spezielle Teilreaktion beeinflusst wird — und hat sich meist damit begnügt. Die physikalisch-chemische Frage, *wie und warum* diese Beeinflussung eigentlich stattfindet, scheint — vielleicht mit Unrecht — ein verhältnismässig unwichtiger Punkt im Arbeitsprogramm der der Grossindustrie angeschlossenen Forschungsstätten zu sein. M. OESTERLIN schreibt mit Recht in seiner ausgezeichneten Mono-

graphie »Chemotherapie« (1938 a): »Diese Dissonanz hat ihren Ursprung darin, dass es gerade von den massgebenden Chemotherapeuten immer wieder abgelehnt wird, dass irgendwelche Beziehungen zwischen der chemischen Konstitution und der chemotherapeutischen Wirkung vorhanden sind. Es ist erstaunlich, mit welcher Ausdauer auf der einen Seite dieser Standpunkt aufrecht erhalten wird, während auf der anderen Seite immer wieder Antisymphilitica unter den Arsenobenzolen, Malariaheilmittel unter den Chinolin- und Acridinderivaten, Anthelminthica unter den Phenolderivaten, Antimonkomplexsalze gegen bestimmte Trematoden gesucht werden. Dieser Gegensatz ist eigentlich bei objektiver Betrachtung unvereinbar, und wenn auch heute noch das Prinzip des kostspieligen Reihenversuchs unter empirischen Kautelen aufrecht erhalten werden muss, dann nicht deswegen, weil keine Beziehungen zwischen Konstitution und Wirkung vorhanden sind, sondern einzig und allein aus der betrüblichen Tatsache heraus, weil wir diese Verhältnisse immer noch nicht definieren können.« Man könnte hinzufügen, dass hier letzten Endes auch rein praktisch-ökonomische Gesichtspunkte mitsprechen. Beim Suchen nach klinisch brauchbaren Präparaten wird natürlich die Arbeitsweise gewählt, die am schnellsten zum Erfolg führt. Der Reihenversuch mit einer grossen Anzahl von Derivaten einer empirisch aufgefundenen physiologisch wirksamen Grundsubstanz ist für den Praktiker z. Z. ein weit sichererer Weg zur Auffindung selektiver und wirksamer Präparate als ein physiologisch-chemisch-physikalisches Suchen nach den theoretischen Grundlagen des Zusammenhanges zwischen Struktur und Wirkung.

Bei dem Bemühen, diese Grundlagen klarzulegen, müssen den chemisch-physiologischen Versuchen, die primären Eingriffe chemischer Stoffe zu lokalisieren, chemisch-physikalische Untersuchungen über die inneren Ursachen der *spezifischen Erscheinungen* folgen. Dies bringt naturgemäss eine Verknüpfung der spezifischen Einwirkung auf ein lokalisiertes Teilsystem mit der Struktur gewisser Atomgruppierungen der einwirkenden Stoffe mit sich. Jeder Chemiker, der sich mit diesen Fragen beschäftigt hat, weiss von vornherein, welche Schwierigkeiten hierbei zu erwarten sind. Alle bisherigen Versuche, die physiologische Wirkung einer Substanz ganz allgemein auf die Strukturformel zurückzuführen, sind gescheitert. Die Ursache hierfür liegt letzten Endes im Gedankengang der klassisch-organischen Chemie, die



dem Formelbild eine erschöpfende Beschreibung der Molekularstruktur zuerkennt. Die Strukturformel als solche gibt nur ein durchaus schematisches Bild von der Zusammensetzung und den Prinzipien der Bauart eines Moleküls, sagt aber nichts über Bindungsenergetik und räumliche Ausdehnung, trotzdem bei jeder Beteiligung eines Moleküls an einem Reaktionsvorgang *gerade diese letzteren Faktoren für den Verlauf bestimmend sind*. Die heutige organische Chemie, wie sie durch die hervorragenden Arbeiten von ARNDT, HÜCKEL, PAULING u. A. neugeschaffen worden ist, erkennt in der Strukturformel nur eine »Grenzformel«, die die strukturelle Angliederung verschiedener Atome in der *einfachsten Schreibweise* darstellt. Die Entdeckung der Mesomerie hat z. B. die ganze Auffassung der Aromatenstruktur so geändert, dass die *endgültige* Festlegung einer Struktur in einer Strukturformel nicht zulässig ist. Das Molekül muss als »irgendwo in der Schweben« zwischen zwei oder mehreren Grenzzuständen befindlich aufgefasst werden, und über seine Lage geben nur Untersuchungen energetischer Verhältnisse Aufschluss.

Die folgenden Abschnitte II bis III geben nun eine allgemeine Übersicht über die Beziehungen zwischen physiologisch gleichartig wirkenden Verbindungen *in Bezug auf gemeinsame Faktoren der inneren Energetik und des Wirkraumes*. Diese Übersicht ist keineswegs eine vollständige, ist aber der Versuch die allgemeinen Gründe, wonach physiologische Systeme organische Verbindungen klassifizieren, zusammenzustellen. Eine allgemeine Gesetzmässigkeit ist natürlich von vornherein nicht zu erwarten, aber die räumlich-energetische Betrachtungsweise lässt manche Beobachtungen über die Struktur und Wirkung organischer Verbindungen, die vom klassischen Standpunkt aus unverständlich waren, in neuem Licht erscheinen. Besonders gilt dies für das rätselhafte Verhalten des Geruchssinnes beim Einwirken organischer Verbindungen. Diese rein theoretischen Überlegungen werden später mit einigen experimentellen Resultaten verglichen, die bei einer Untersuchung der spezifischen Adsorption einiger Reihen homologer Substanzen gewonnen worden sind.

---

## II.

### Die Prinzipien der Betrachtungsweise und das zugängliche Tatsachenmaterial.

Allgemeines. Eine vergleichende Untersuchung über organische Verbindungen in Bezug auf ihre physiologische Wirkung muss mit der allergrössten Vorsicht unternommen werden. Jeder Versuch, verschiedene Faktoren zusammenzustellen, die die physikalisch-chemische Grundlage physiologischer Reaktionen bilden, bedeutet ein relativ oberflächliches Antasten eines z. Z. noch recht unbekannten Arbeitsfeldes. Es handelt sich hier darum, fundamentale Tatsachen aus Gebieten, die einander noch ziemlich fremd sind, in logischer Weise zusammenzustellen, nämlich aus der mathematisch begründeten Physik und der deskriptiven Biochemie. Das Material beider Gebiete ist enorm, aber lückenhaft, und man läuft bei seiner Behandlung stets Gefahr, sich in unwesentliche Details zu verlieren. Der Grundgedanke der hier folgenden Betrachtungsweise ist der, einen chemischen Eingriff in ein physiologisches System möglichst unabhängig von der Natur des Systems und den Reaktionen des Systems als Ganzem zu behandeln. Diese Einstellung ist durchaus notwendig, um zu einer prinzipiell gleichen Behandlung verschiedener Systeme zu gelangen und eine Untersuchung über *die Möglichkeiten des Austausches gewisser Teilstrukturen der Verbindungen unter Beibehaltung der Wirkung* machen zu können.

Die Arbeitsweise.

Es ist klar, dass diese Arbeitsweise die z. Z. einzig mögliche ist. Unter obigen Voraussetzungen sind wir berechtigt, z. B. die lokalanästhetischen Eigenschaften von 2-Äthoxy-6-Aminobenzthiazol und dem entsprechenden Chinolinderivat mit der trypanoziden Wirkung von 2-Anil-Benzthiazoliumsalzen und den analogen Chinolinium-Verbindungen in einen logischen Zusammenhang in Bezug auf *die gegenseitige Austauschbarkeit der Thiazol- und Pyridin-Kerne unter Beibehaltung der resp. Wirkungen*

zu bringen. Aus weiteren Beobachtungen — z. B. über das im Grund gleichartige Verhalten von 2-Sulfanilaminothiazol und 2-Sulfanilaminopyridin — lassen sich gewisse Schlüsse ziehen, in wie weit die analogen Wirkungen von Thiazol- und Pyridin-Derivaten als eine allgemein-physiologische Erscheinung zu betrachten sind. Über die Natur dieser Wirkungen wird also nichts gesagt. Durch Beobachtung wird nur festgestellt, dass die betr. Wirkungen durch »etwas« dem Thiazol- und Pyridin-Kern *Gemeinsames* hervorgerufen werden, das sich weiterhin mit den analogen elektronstrukturellen Verhältnissen der beiden Kerne in Zusammenhang bringen lässt.

Als Beobachtungsmaterial für diese Betrachtungsweise sind natürlich solche Systeme besonders geeignet, bei denen chemische Eingriffe möglichst einfache physiologische Reaktionen auslösen. Es ist schon betont worden, dass bei einem chemischen Eingriff nur in sehr seltenen Fällen der Verlauf der betroffenen physiologischen Teilreaktion einer direkten Registrierung zugänglich ist. Meist ist man auf die Beobachtung allgemeiner physiologischer Aktivitätsstörungen angewiesen. Hieraus ergibt sich eine gewisse Unsicherheit, besonders, wenn der kausale Zusammenhang zwischen jenen Reaktionen des Systems als Ganzem und der primären Einwirkung ein komplizierter ist. So ist es leicht möglich, dass zwei Verbindungen durch irgend welche Beeinflussung zwei verschiedener Teilreaktionen, jedoch ein und dieselbe charakteristische Störung im System auslösen können. Ein Vergleich der Strukturen dieser beiden Verbindungen würde zu den eigentümlichsten Schlussfolgerungen führen. Es muss also streng darauf geachtet werden, dass die Voraussetzung besteht, dass mehrere zu vergleichende Verbindungen in denselben Teilvorgang eingreifen. Folglich muss die Untersuchung über gemeinsame Strukturaktoren analog »wirkender« Verbindungen auf gewisse Verbindungsklassen begrenzt werden. Bei Verbindungen mit einer besonderen Wirkungsgruppe, wie etwa Arylarsinsäuren, können z. B. in Bezug auf trypanozide Wirkung die Umbaumöglichkeiten der Moleküle geprüft werden, soweit diese sich nicht auf die  $-\text{As}(\text{OH})_2-$  Gruppe erstrecken. Solange diese intakt ist, hat man eine gewisse Garantie dafür, dass die resultierende Wirkung der Verbindungen durch prinzipiell denselben Primäreingriff ausgelöst wird. Bei Verbindungen, deren wahrscheinlicher Wirkungsbezirk weniger scharf abgegrenzt ist, oder bei denen dieser das ganze Molekülgerüst umfasst (Germanin!), ist

es natürlich viel schwerer, das Prinzip des analogen Primäreingriffs beizubehalten. Der Austausch gewisser Teilstrukturen in solchen Verbindungen unter Beibehaltung der Wirkung muss mit grösster Vorsicht gemacht werden und man muss sich hier im allgemeinen auf den Austausch gewisser Alkylgruppen beschränken. *Das Material der physiologisch-aktiven Verbindungen ist somit der vergleichenden Analyse der Strukturfaktoren unter den Bedingungen zugänglich, dass diese Untersuchung sich auf bestimmte Verbindungsklassen beschränkt und dass für jede Klasse ein und derselbe Primäreingriff vorausgesetzt wird.*

Es wäre natürlich wünschenswert, dass bei den verschiedenen physiologischen Systemen die ausgelösten Störungen in möglichst definierter Weise registriert werden könnten. Bei einer überwiegenden Anzahl chemischer Verbindungen, die toxisch auf Mikroorganismen wirken, ist das Absterben der Organismen das Reagenz der Einwirkung. In gewissen Fällen ist durch *in vitro*-Versuche die Intensität der Beeinflussung festzustellen. Diese geht aus Messungen der letalen Konzentration der betr. Verbindungen hervor. Es braucht wohl nicht betont zu werden, dass der Wert des *in vitro*-Versuches für die Beurteilung der Einwirkungsintensität einer Verbindung auf ein physiologisches System *in vivo* meistens sehr gering ist. Jedoch lassen sich hieraus oft gewisse Schlüsse ziehen auf das etwaige Vorhandensein gemeinsamer Faktoren der Struktur aktiver Verbindungen. Bei der chemischen Einwirkung auf Mikroorganismen unter physiologischen Bedingungen ist es schwerer, ein Reagenz der Wirkungsintensität zu finden. Die *Dosis curativa*, wie sie durch verschiedene standardisierte Tierversuche bestimmt wird, kann hier als Anhalt dienen, obwohl dieser Wert ein Masstab sowohl für die direkte chemische Einwirkung auf die betr. Mikroorganismen, als auch für die Beeinflussung der Abwehrkräfte des Wirttieres sein kann. Der therapeutische Index hat vom physikalisch-chemischen Gesichtspunkt aus unbedeutenden Wert in Bezug auf die Strukturanalyse und ist ja schliesslich nur ein Symbol für den Unterschied der Wirkungsintensität auf die Mikroorganismen und das Wirttier. Bei manchen Systemen lassen sich spezialisiertere physiologische Reaktionen als Reagens der chemischen Beeinflussung gebrauchen, wie z. B. gestörte Sekretionsvorgänge. Weiter besitzen wir in Beobachtungen über das bioelektrische Verhalten des Nerven- oder Muskelgewebes ein Reagens für den Eingriff einer grossen Anzahl von Verbindungen, z. B. der Lo-

Die Registrierungsmöglichkeiten.

kalanästhetika. Die Minimalkonzentration einer örtlich applizierten Verbindung, die die Aufhebung des Vermögens zur Reizübertragung bewirkt, kann — mit Vorsicht gebraucht — bei der vergleichenden Strukturanalyse dieser Stoffe von gewissem Wert sein.

Die Stellung  
der Riech-  
und Ge-  
schmackstoffe.

In diesem Zusammenhang taucht die Frage auf, ob man nicht eine bisher unausgenutzte Quelle physiologisch-chemischen Geschehens benutzen könne, nämlich die physiologische Klassifizierung chemischer Agenzien des Geruch- und Geschmacksinnes. Dieser Vorschlag wirkt vielleicht zunächst etwas zu optimistisch. Aber wir haben ja doch das Recht, die Riech- und Geschmacksstoffe nach dem erwähnten Prinzip der beibehaltenen Wirkung zu untersuchen, *wenn wir dabei von der Wirkungsweise absehen* und nur in Bezug auf die Molekularstruktur gemeinsame Gesichtspunkte aufsuchen wollen. Hierbei sind aber einige spezielle Vorsichtsmassregeln zu beachten.

Psychologi-  
sche Vor-  
behalte.

Der chemische Eingriff, der in anderen physiologischen Systemen einer *objektiven* Beobachtung zugänglich ist, wird beim Geruch- und Geschmacksinn einer rein *subjektiven* Registrierung unterworfen. Was wir als einen speziellen Sinnesindruck empfinden ist das Resultat der cerebralen Integration verschiedener Kombinationen von Nerv-Impulsen, die von gewissen Rezeptorenzellen-Kombinationen ausgesandt werden. Der Weg vom primären Angriff der Stoffe auf die Sinneszellen bis zu dessen endgültiger Registrierung ist sehr kompliziert und führt über eine grosse Anzahl von Umkopplungen in verschiedenen Synapsen der beteiligten Leitungsbahnen. Die spätere, mentale Bearbeitung des eingesandten »code«-artigen — aus einem Komplex von Aktionspotentialen zusammengesetzten — Tatsachenmaterials liegt im Verhältnis zum Primärprozess sozusagen in einer anderen Dimension und ist nicht imstande, absolute Aussagen über den charakteristischen Ablauf des Primärprozesses zu machen. Jeder chemische Eingriff in den Rezeptionsapparat schafft in den zentralnervösen Regionen ein »Registrierungsbild«, das sich dem Gedächtnis einprägen wird, wenn sich der primäre Prozess hinreichend oft wiederholt hat. Die Beziehungen zwischen einem speziellen Sinnesindruck und dem chemischen Primärprozess beruhen letzten Endes auf einer Identifizierung des betr. Registrierungsbildes mit einem Analogon, das das Resultat eines anderen chemischen Primärangriffes darstellt. Dieser bewusste oder unbewusste Vergleichs- und Identifizierungsprozess benutzt

als mentalen Standard Registrierungsbilder, die vom Eingriff einzelner Substanzen oder Mischungen herrühren, die in das alltägliche Geruchs- und Geschmacksleben in kontrastreicher Weise eingreifen. Die verschiedenen Registrierungsbilder, von denen jedes in einem speziellen Verhältnis zu je einem gewissen chemischen Primäreingriff steht, werden unmittelbar nach diesem Eingriff »herangeholte«, resp. »aktiviert« oder »mobilisiert« (oder wie man es nennen will) und mit der neuen Registrierung, wie sie sich aus der mentalen Entzifferung des Aktionsstrombildes ergibt, verglichen. In der Beurteilung der Geschmacks- und Geruchsqualität einer Substanz, wie »kampherähnlich« oder »süß« liegt ein allgemeines Vergleichen des betr. Registrierungsbildes mit den »Standardbildern«, die in gewissen Beziehungen zur primären Einwirkung von Kampher und z. B. Saccharose stehen. Ist das Registrierungsbild einer gewissen Primäreinwirkung mit einem von den im Geruchs- und Geschmacksgeächtnis vorhandenen Standardbildern schwer zu identifizieren, so wird die Qualität des betr. Geruchs- oder Geschmackseindrucks durch allgemeinere Ausdrücke charakterisiert. Man spricht dann z. B. von Stoffen mit »eigentümlichem« oder »aromatischem« Geruch und »fadem« Geschmack.

Das »absolute« Geruchs- und Geschmacksgeächtnis ist aber im Vergleich zum Gehör- und Gesichtsgedächtnis ziemlich schwach entwickelt. Es ist ja eine allgemein anerkannte psychologische Tatsache, dass das Gedankenleben, das mit optischen und akustischen Gedächtnisbildern durchsetzt ist, durch nur sehr wenige Komponenten eines Geruchs- oder Geschmackserlebnisses gefärbt ist. (Vgl. HENNING 1922 a.)

Ist nun dieser physiologische und psychologische Zusammenhang zwischen der primären Rezeption einer Substanz und dem resultierenden »Eindruck« der Registrierung ein logischer? Hat man das Recht zu behaupten, dass zwei Verbindungen, die z. B. sehr ähnliche Geruchsempfindungen hervorbringen, auch gleichartige Veränderungen im Rezeptionsapparat bewirken? Man kann hier nicht vorsichtig genug sein. Der Verlauf der Leitungsbahnen über die verschiedenen Synapsen und die Möglichkeiten, die von den Kollateralen zur Überkopplung und Übertragung der Aktorenströme an Fasern verschiedenartiger Systeme gegeben werden, deutet mit grösster Wahrscheinlichkeit darauf hin, dass das ursprüngliche Aktionsstrombild, wie es sich von den Rezeptorenzellen aus entwickelt, auf dem Wege zu den zentralen Regionen allmählich seinen ursprünglichen Charakter verliert.

Wahrscheinlich besteht die Möglichkeit, dass zwei Stoffe, die verschiedenartig in den Rezeptionsapparat eingreifen, auf Grund cerebraler Transformationen der ausgesandten Aktionskomplexe doch denselben »Eindruck« hervorrufen können. Um Trugschlüsse zu vermeiden, müssen wir also die Bedingungen, unter welchen wir verschiedene Geruchs- und Geschmacksempfindungen in Bezug auf den Primärangriff und hinsichtlich der Konstitution einwirkender chemischer Verbindungen vergleichen dürfen, sehr exakt formulieren; etwa so: *Wenn zwei Verbindungen einer im Grund analogen Konfiguration dieselbe oder typanaloge Geruchs- oder Geschmacksempfindung hervorrufen, so lässt dies grundsätzlich auf ein und dieselbe Eingriffsweise schliessen.*

Was hier mit »im Grund analoger Zusammensetzung« gemeint ist, ist wie bei allen anderen chemischen Einwirkungen auf physiologische Systeme die Forderung, dass die Verbindungen in einfacher Weise verwandt sind. Solche Verbindungen sind z. B. strukturanaloge Pyridin- und Thiazol-Verbindungen, homologe aliphatische Mercaptane und überhaupt verschiedene Alkylderivate ein und derselben Grundsubstanz. Dementsprechend ist es also nicht ohne weiteres zulässig, die Süßwirkung von Glukose und Saccharin zu vergleichen, wohl aber die der aliphatischen Polyhydroxyverbindungen, weil die Wahrscheinlichkeit einer prinzipiell gleichen Eingriffsweise bei Saccharin und Glukose im Vergleich mit der entsprechenden Primärwirkung der verschiedenen Kohlenhydrate z. B. gering ist. Bei Beachtung dieser Vorsichtsmassregeln sind gewisse Verbindungsgruppen aus dem reichen Material der Riech- und Geschmackstoffe brauchbar, um einen weiteren Beitrag zur Frage der gemeinsamen Strukturfaktoren bei Verbindungen mit analoger physiologischer Wirkung zu liefern. Geruch- und Geschmacksinne bilden doch letzten Endes nur ein Spezialgebiet unter den physiologisch chemischen Systemen, die das Eingreifen einer chemischen Verbindung mit ganz speziellen Reaktionen beantworten.

Definition.

**Zur Frage der Spezifität.** Während die speziellen Reaktionen einer einzelnen Zelle, eines Organes, Organkomplexes oder eines Organismus als Ganzem auf chemische Eingriffe äusserst verschiedenartig sein können, ist für eine grosse Anzahl von Verbindungen die Einwirkungsweise auf gewisse prinzipiell gleichartige Vorgänge zurückzuführen. Wenn man von allgemeinen Beeinflussungen, wie sie z. B. pH-Änderungen und Denaturierungsvorgänge bewirken, absieht, geschieht der Eingriff einer

Verbindung mehr oder weniger *spezifisch*. Dieser Begriff ist ziemlich dehnbar, je nach der Natur des betr. Systems und der Art der chemischen Einwirkungsweise. Bei physiologischen Systemen in *natürlicher* Umgebung besteht eine ausgesprochene Spezifität der Wirkungsweise verschiedener Wirkstoffe den betr. Substraten gegenüber. Für z. B. die Cholinesterase in den Synapsen des parasympathischen Nervensystems ist das Acetylcholin das spezifische Substrat. Wenn man die physiologische Umgebung verlässt und in *in vitro*-Versuchen unphysiologische Substrate darbietet, lässt sich eine zunehmende Reichweite des Enzyms beobachten. Das Vermögen der Esterase, andere Cholinester, weiter Acetyl- $\beta$ -Methylcholin und Acetyl- $\gamma$ -Homocholin, sowie Acetylphospho- und -arsenocholin zu spalten, zeigt, dass die »spezifische« Spaltung von Acetylcholin auf eine allgemeine Einstellung des Enzyms auf die Atomgruppierung  $\text{—OCH}_2\text{CH}_2\text{R}^+$   $(\text{CH}_3)_3$  zurückzuführen ist (AMMON, 1937).

Diese Betrachtungsweise lässt sich auf die meisten physiologischen Systeme übertragen. In natürlichem Milieu ist die Spezifität eines Wirkstoffes, der auf eine bestimmte Atomkombination abgestimmt ist, somit nicht nur als eine Funktion dieser speziellen Teilstruktur anzusehen, sondern ist auch auf die *zugängliche Anzahl von Verbindungen dieser Struktur, die im System vorhanden ist*, zurückzuführen. Gewöhnlich ist diese ja sehr gering, was zu einer — formell — streng spezifischen Wirkungsweise des Wirkstoffes führt. Die absolute Reichweite des in *in vitro*-Versuchen geprüften Wirkstoffes an sich kann sich dagegen auf eine weit grössere Anzahl von Varianten der »natürlichen« Substrate erstrecken.

Die Grenzen der Spezifität eines chemisch-physiologischen Vorganges sind von verschiedenen Faktoren abhängig. Auffallend ist, dass physiologisch wirksame Verbindungen, deren Wirkung man zunächst keiner spezialisierteren Wirkungsgruppe zuschreiben kann, eine zunehmende Selektivität bei ansteigender Molekulargrösse aufzuweisen scheinen. Die Immunreaktionen stehen dem Ideal einer strengen Selektivität am nächsten, wenn auch die Untersuchungen von LANDSTEINER u. A. gezeigt haben, dass die selektive Verankerung der Azoproteine an einen entsprechenden Antikörper in speziellen Fällen von geringfügigen Änderungen in der Struktur des Azo-Restes unbeeinflusst bleibt, LANDSTEINER (1932 a). Die Hemmung der Aryl-azo-Antigen-Antikörper-Reaktionen mit niedermolekularen arylazoanalogen Haptenen zeigt

Physiologische und unphysiologische Substrate.

Die Grenzen der Spezifität.



aber, dass die letzteren keine ausgesprochene Spezifität besitzen. Vielmehr können hier mehrere Derivate dieselben Hemmungserscheinungen hervorrufen, MARRACK (1938 a). Unter den Derivaten des Germanins (Mol. gewicht 1428) gibt es schon einen recht grossen Spielraum für Strukturvarianten mit analogem Wirkungstypus (Siehe FISCHL-SCHLOSSBERGER, 1934 a), obwohl natürlich die Wirkungsintensität und der Index gewisser Variation unterworfen sind.

Spezifität der  
Riech- und  
Geschmack-  
stoffe.

Auch bei Riech- und Geschmackstoffen mag die gleichartige Wirkung gewisser strukturanalogen Verbindungen einer Spezifität (mit ziemlich grosser Reichweite) zugeschrieben werden. Die analoge Geruchswirkung von Benzol und einer Anzahl von Homologen z. B. geht sicher nicht auf eine direkte chemische Beteiligung der Stoffe in den Rezeptorzellen zurück. Vielmehr kann man bei den meisten Riech- und Geschmackstoffen von einer nicht-reaktiven Einwirkungsweise im Sinne einer mehr oder weniger spezifischen Adsorption sprechen. (Siehe weiter Abschn. V.) Man könnte hier ganz allgemein von verschiedenen Graden der *Verankerungsspezifität* sprechen, weil zweifellos bei den speziellen Erscheinungen dieser Typenbeispiele eine gegenseitige Anlagerung der beteiligten nieder- und hochmolekularen Komponenten stattfindet. Von immunchemischer Seite ist auf die Parallele der Antigen-Antikörperreaktionen und der Bildung von Molekularverbindungen hingewiesen worden (ERLENMEYER u. BERGER 1932, BERGER 1935, 1937).

• Veran-  
kerungs-  
spezifität. •

Die Verankerungsspezifität wird von letzteren Autoren im Falle der Immunreaktion auf eine — buchstäblich zu nehmende — gegenseitige strukturelle Feinabstimmung der Komponenten zurückgeführt. Verschiedene Beobachtungen auf dem Gebiet der spezifischen Adsorption in nicht-biologischen Systemen berechtigen einigermaßen zu dieser Anschauung.

• Reaktive  
Spezifität. •

Bei Verbindungen, die die Möglichkeit besitzen, in einen physiologischen Vorgang selbst reaktiv einzugreifen, ist die evt. Spezifität des Eingriffes eine kompliziertere Frage. Es gibt zwar verschiedene Beispiele für Verbindungen, die, ohne irgendwelche bestimmten Verankerungserscheinungen aufzuweisen, direkt *reaktivspezifisch* wirken. Die Spezialeinrichtung jener Stoffe basiert sozusagen auf »reaktiver Einpassung« in bestimmte Teilvorgänge eines physiologischen Systems. Es ist jedoch die Frage, inwieweit man solche Erscheinungen als echt spezifisch betrachten kann. Die Wirkungsweise von z. B. Pyocyanin auf das At-

mungssystem der Hefe ist ganz von speziellen Redoxverhältnissen abhängig, die eine reaktive Einpassung in einen speziellen Teilvorgang der Atmungskette ermöglichen. Ein anderes Beispiel ist die Restitution des Reizleitungsvermögens stickstoff behandelter Nervenzellen durch gewisse leicht reduzierbare Verbindungen. Dem Befund von COHEN und GERARD (1933), nach dem m-Dinitrobenzol die anaerobe Reizleitungsblockierung aufheben kann, liegt sicher keine strukturspezifische Anlagerung zugrunde, sondern er beruht auf ganz speziellen Möglichkeiten des Stoffes, als Wasserstoffacceptor zu dienen. Der weitere Befund, nach dem andere Verbindungen das analoge Vermögen besitzen, sofern sich das Redoxpotential innerhalb gewisser Grenzen hält, bestätigt diese Auffassung. Ein anderes Beispiel ist die reaktionsspezifische Wirkung von Jodessigsäure auf SH-Verbindungen, u. s. w. Die Beispiele lassen sich beliebig vermehren.

Wird aber die reaktive Wirkung erst nach vorangehender Anlagerung an bestimmte hochmolekulare Komponenten entwickelt (z. B. Cofermentwirkung), so scheint die spezielle Verankerung die Voraussetzung für das Zustandekommen der spezifischen Reaktion zu sein. Die speziellen reaktiven Eigenschaften des Komplexes gehen primär auf das Vorhandensein einer oder mehrerer Wirkungsgruppen in den niedermolekularen Komponenten zurück. Um eine spezifische Beeinflussung einer zweiten niedermolekularen Verbindung zu erreichen, muss meistens diese zuerst direkt an den Komplex verankert werden, bevor der eigentliche Reaktionsvorgang stattfinden kann. Die Einwirkungsweise des ganzen Komplexes kann also sowohl verankerungsspezifisch als auch reaktivspezifisch sein. Somit wird das allgemein-chemische reaktive Verhalten einer oder mehrerer Wirkungsgruppen einer Verbindung in homogenem Milieu einer Spezialisierung unterworfen, wenn die betr. Verbindung an bestimmte Komponenten eines mikroheterogenen Systems verankert wird.

Die allgemeine Anwendung des Spezifitätsbegriffes auf die verschiedensten chemisch-physiologischen Vorgänge ist nicht immer angebracht. Die speziellen Wirkungen des Laktoflavins z. B. sind nicht für diese Verbindung *an sich* spezifisch, sondern beziehen sich auf das Verhalten gewisser Laktoflavin-Phosphorsäure-Proteinaddukte. Es bestehen jedoch für den Proteinkomponenten des gelben Ferments Möglichkeiten zur selektiven Anlagerung gewisser anderer Flavine, wenn auch unter diesen Ad-

Vorsichts-  
massnahmen.

dukten nur ganz wenige die charakteristischen Eigenschaften des Fermentes selbst besitzen. Der Primärvorgang der Adduktbildung muss also auch als spezifisch angesehen werden, wenn auch in geringerem Grade. Überhaupt wird allgemein beim Gebrauch des Begriffes »Spezifische Wirkung« die *Spezifität der primären Einwirkung* der betr. Stoffe nicht besonders betont. Doch liegt in diesen Vorgängen die erste Differenzierung des Eingriffes. Es wäre vielleicht angebracht, für das primär selektive Eingreifen verschiedener Stoffe in physiologische Systeme eine zusammenfassende Bezeichnung zu schaffen. Der Ausdruck *chemoselektive Wirkung* könnte hier mit einiger Berechtigung benutzt werden. Dieser Ausdruck — wie er im Folgenden gebraucht wird — deutet einfach darauf hin, dass der primäre Eingriff einer Substanz *selektiv* in einem bestimmten Teilvorgang eines physiologischen Systems geschieht und dort zu speziellen chemischen Veränderungen führt. (Die Vorsilbe *chemo-* ist gebraucht, um anzugeben, dass die Wirkungen primär durch ein chemisches Agens ausgelöst werden, im Unterschied zu z. B. Ultraschallwirkungen.)

Die chemoselektive Wirkung.

**Distributionsfaktoren.** Bevor eine Untersuchung der innermolekularen Struktur chemoselektiv wirkender Stoffe unternommen werden kann, müssen noch einige besondere Vorsichtsmassnahmen berücksichtigt werden. Ausser den speziellen Faktoren der selektiven Verankerung und reaktiven Einpassung wird der Verlauf eines chemoselektiven Vorganges auch noch durch die allgemeinen Faktoren der Distributionsweise der betr. Stoffe bestimmt. Die allererste Voraussetzung für eine chemoselektive Wirkung ist natürlich die, dass der betr. Substanz die Möglichkeiten geboten werden, überhaupt an den Wirkungsort zu gelangen. Die Art und Weise, wie eine Substanz zum Bezirk der spez. Einwirkung geführt werden kann, kann selbstverständlich sehr variieren, sowohl in Bezug auf die Natur des angreifenden Systems als auch bezüglich der Applikationsweise.

In den allermeisten Fällen werden die Substanzen in solvatisiertem Zustand an den Wirkungsort gelangen, niedermolekulare Stoffe als echte, hochmolekulare als kolloidale Lösungen. Seltenere ist die Beförderung von Substanzen in grobdispersen Suspensionen oder Emulsionen; ein Spezialfall ist die der gasförmigen Riechstoffe. Voraussetzung für eine Einwirkung ist also — mit wenigen Ausnahmen —, dass die betreffende Substanz eine gewisse Solvatisierungstendenz besitzt. Die Beförde-

rung von Substanzen in echter Wasserlösung durch einfache Diffusion oder durch spezialisierte Kreislaufsysteme braucht hier nicht weiter erörtert zu werden, ebensowenig diejenige grob-disperser Emulsionen und Suspensionen. Eine wichtige Frage aber, die berücksichtigt werden muss, ist die der schliesslichen Akkumulation eines Stoffes am Wirkungsort. Die Intensität der Wirkung ist ja vor allem eine Konzentrationsfrage. Jede Substanz, die die Eigenschaften besitzt, eine spez. Wirkung auf ein spez. System auszuüben, muss die Voraussetzungen für irgend eine Abfangmöglichkeit bei der Ankunft an dem betr. System haben. Abgesehen von den spez. Verhältnissen bei der rein chemisch-spezifischen Verankerung an gewisse Komponenten des Systems müssen die Möglichkeiten der unspezifischen Anreicherung auf Grund der Solvatationsverhältnisse in verschiedenen Medien beachtet werden.

Eine Frage, die hier immer wieder auftaucht, ist die der *Lipoidlöslichkeit*, die in unzähligen Arbeiten von den verschiedensten Gesichtspunkten aus behandelt worden ist. Nachdem zuerst die Intensität der Narkotikawirkung in OVERTONS klassischen Arbeiten mit der Lipoidlöslichkeit in Verbindung gebracht wurde, sind andere Gruppen chemoselektiver Stoffe in analoger Weise in Bezug auf ihre lipoidlöslichkeitsbedingte Wirkungsintensität untersucht worden. (Siehe z. B. MEYER-GOTTLIEB, 1936 a.) BACKMAN (1917) hat z. B. in sehr gewissenhafter Weise für mehrere Reihen von Aliphatenhomologen die Reizschwelle der Geruchsensitivität sowie die Verteilung der Stoffe zwischen Lipoid und Wasser bestimmt. Ein Überblick über dieses Gebiet zeigt heute, dass zwar ein gewisses, aber keineswegs einfaches Verhältnis zwischen physiologischer Intensität und Lipoidlöslichkeit besteht und dass die Verhältnisse bei den verschiedenen Systemen sehr variieren, PARKER (1922 a).

Die »Lipoidlöslichkeit«.

Es ist klar, dass, wenn eine Substanz eine physiologische Reaktion beeinflusst, die sich in *lipoidhaltigem Milieu* abspielt, die Anreicherungsmöglichkeit der Substanz am Wirkungsort um so günstiger ist, je mehr bei ihrer Verteilung zwischen Wasser und Lipiden das Verhältnis zugunsten der letzteren verschoben wird. Unter vielen Klassen gruppenreaktiv wirkender Stoffe — wie z. B. Phenole — scheinen diejenigen, die eine angekoppelte Kohlenwasserstoffkette enthalten, in lipoidhaltiger Umgebung bessere Voraussetzungen für die spez. »Gruppenwirkung« zu besitzen als die, bei denen sich ein Polyhydroxy-Rest im Molekül

befindet. Diese Erscheinung beruht im Grund auf der speziellen Struktur des »Lipoids«. Der klassische (und sehr unzulängliche) Ausdruck »Lipoid« ist eigentlich der Sammelbegriff für wasserunlösliche Stoffe mit langen Kohlenwasserstoffketten. Die Verteilung einer chemischen Verbindung zwischen »Lipoid« und Wasser ist sowohl eine Funktion der Struktur der betr. Substanz als auch der des »Lipoids«. Diejenigen vom Lecithintypus z. B. können eine Substanz gut anreichern, die sich Sterinen gegenüber »unlöslich« verhält.

Die Flüchtigkeit.

Einen Spezialfall der Distribution chemoselektiver Stoffe bildet die Beförderung von Riechstoffen. Diese Stoffe gelangen durch einfache Diffusion in Gasphase, vom Respirationsmechanismus unterstützt, zum Wirkungsort. Dieser folgt wahrscheinlich eine Akkumulation in den lipoidhaltigen Teilen der Riechzellen (vgl. Seite 125). Die Solvatisierungsmöglichkeiten in der Gasphase werden hier durch den Dampfdruck der Substanz bestimmt. Man muss dabei in Betracht ziehen, dass die Dampftension eines Stoffes in Lösung vom Lösungsmittel beeinflusst werden kann, wie z. B. die Flüchtigkeit der Riechstoffe durch den Partialdruck des Wasserdampfes in der Luft. (Vgl. CONN, 1924 a). Dazu kommt, dass das Lösen von Riechstoffen in flüssigen oder festen Medien die Verhältnisse noch mehr kompliziert, weil hier die Dampftension der Stoffe auch von diesen Lösungsmitteln beeinflusst werden kann. Der Geruch von Jodoform z. B. wird in seiner Intensität beinahe bis zur Geruchlosigkeit herabgesetzt, wenn der Stoff in Paraffinöl gelöst wird.

Permeabilität.

Ein weiterer Distributionsfaktor, der in gewissem Zusammenhang mit den besprochenen Lösungsverhältnissen steht, ist das Vermögen der Stoffe, verschiedene Membranstrukturen zu durchdringen. Bei jedem chemoselektiven Eingriff in irgend ein intrazelluläres System sind verschiedene Permeabilitätsfaktoren in Bezug auf die Intensität der Wirkung zu berücksichtigen. Diese stehen in einfachen Fällen bekanntlich mit der Membranstruktur in Zusammenhang und vor allem mit der Molekulargrösse der einwirkenden Stoffe. Die Literatur über Permeabilität ist sehr gross; es sei hier nur auf die Sammelwerke hingewiesen.

Addukt-bildung.

Ausser der Löslichkeit und der Permeierungsmöglichkeit kann noch ein ganz spezieller Faktor in die Distribution eingreifen, nämlich die Möglichkeit der Beförderung als Addukt durch z. B. Glukuronsäure- und Cholsäure-Kopplung. Bei Substanzen mit Voraussetzungen eines derartigen Verhaltens muss man stets die

Möglichkeit in Betracht ziehen, dass der Stoff nicht als solcher, sondern als Addukt an das betr. System gelangt. Hierher gehört gewissermassen auch die Möglichkeit der primären Umwandlung einer Substanz, die in »umgebautem« Zustand zum Wirkungsort befördert wird (leicht spaltbare Ester z. B.).

Die Beachtung der Distributionsfaktoren ist, wie schon betont wurde, sowohl eine Vorsichtsmaßregel als auch eine Voraussetzung für die anschliessende Behandlung der Molekularstrukturfaktoren. Beim Vergleichen verschiedener chemoselektiver Substanzen, die derselben Klasse angehören, ist zunächst sorgfältig darauf zu achten, dass die Distributionsverhältnisse ziemlich analog sind, dass also die Löslichkeits- und Permeabilitäts-Verhältnisse der betr. Substanzen wenigstens von derselben Größenordnung sind. Die Geruchlosigkeit des p-Nitrophenols im Vergleich zu der charakteristisch riechenden o-Verbindung z. B. beruht in erster Linie nicht auf mangelnder Möglichkeit, in der betr. Molekularstruktur eine spezielle Einwirkung auf die Geruchsrezeptoren auszuüben, sondern ist primär auf die geringe Flüchtigkeit der Substanz zurückzuführen. Bei Prüfung einer Klasse chemoselektiv wirkender Verbindungen ist es somit ratsam, bei einem evt. Ausfall der Wirkung einer Komponente zuerst einmal die Aufmerksamkeit auf etwaige veränderte Distributionsfaktoren zu lenken.

---

### III.

## Betrachtungen über die innere Struktur physiologisch wirksamer Verbindungen.

**Allgemeines.** Die heutige Auffassung der organischen Chemie von der gegenseitigen Beeinflussung der Atome eines Molekülgerüsts könnte durch ein *παντα ρει*—alles fließt« veranschaulicht werden. Jeder einzelne Bezirk eines Moleküls scheint von den energetischen Zuständen des Ganzen mehr oder weniger abhängig zu sein. Die Bindungsenergetik zweier einzelner Atomgruppen ist somit keine interne Angelegenheit der beteiligten Komponenten, sondern wird von verschiedenen Nachbaratomen beeinflusst. Andererseits wird jede atomare Wechselwirkung eine Rückwirkung auf verschiedene Bezirke des ganzen Moleküls ausüben. Der Organiker hat sich daran gewöhnen müssen, ein Molekül als einen abgegrenzten Bezirk zusammenwirkender Kraftfelder anzusehen. Anstatt eine einfache Beschreibung der ordnungsgemässen Angliederung der Atome im Gerüst zu geben, hat man jetzt das Bestreben, die gegenseitige energetische Beeinflussung der verschiedenen Einzelatome und Atomgruppen möglichst genau zu bestimmen. Obwohl man auf eine vollständige Lösung dieser Aufgabe verzichten muss, ist in ganz speziellen Fällen die Energetik eines organischen Moleküls einer mathematischen Behandlung zugänglich. Die Elektronstruktur gewisser aromatischer Kohlenwasserstoffe z. B. ist durch — den resp. Systemen speziell angepasste — Approximationsmethoden analysiert worden, wie durch das modifizierte Paulingsche Verfahren (PAULING, 1933) oder durch das Kastenmodell von O. SCHMIDT (1938—39). Beide Verfahren, die sich mit gewissem Erfolg sogar auf die cancerogenen Kohlenwasserstoffe übertragen lassen (SVARTHOLM, 1942, SCHMIDT, 1939) stellen die räumliche Verteilung der  $\pi$ -Elektrone im Molekül dar und lassen also gewisse Aussagen über die Doppelbindungsichte der verschiedenen —C—C-Bindungen zu.

Diese Untersuchungen haben sich bisher nur auf bestimmte »Grundgerüste« erstreckt. Bei der Beschreibung von deren energetischer Beeinflussung seitens angeschlossener Substituenten, wie z. B. Änderung der örtlichen  $\pi$ -Elektronendichte im Molekül, ist man meistens auf eine verallgemeinernde Betrachtungsweise angewiesen.

Man ist also dahin gelangt, eine Symbolik für den Beitrag einer Atomgruppe zur Polarisiertheit und Polarisierbarkeit des ganzen Moleküls zu schaffen, die überhaupt die Wechselwirkung zwischen Molekulargerüst und einzelnen Gruppen in vereinfachter Weise darzustellen vermag. Diese Wechselwirkung wird jetzt meistens rein deskriptiv im Sinne gewisser von den Substituenten ausgehenden »Effekte« behandelt. Es muss vorsichtshalber betont werden, dass diese »Effekte«, wie sie der heutige Organiker als A-, I-, F-, E- u. s. w. Effekte definiert, nur einen Versuch darstellen, zu einer konkreten Bezeichnungsweise der bewirkten energetischen Änderungen im Molekül zu gelangen. Es ist also eine Bezeichnungsweise, deren Anwendung dadurch berechtigt ist, dass sie z. Z. gewissermassen geeignet ist, die abstrakte physikalische Realität hinter gewissen experimentellen Befunden in anschaulicher Weise zum Ausdruck zu bringen. Man darf jedoch nicht übersehen, dass die jetzige Symbolik der Struktur organischer Verbindungen keine erschöpfende Charakteristik der Moleküle gibt. Der Organiker berücksichtigt bei seinem Bestreben, die molekularen Eigenschaften auf die Elektronenverteilung im Molekül zurückzuführen, besonders die reaktiven Möglichkeiten bestimmter Atomgruppen. Es besteht auch eine gewisse Diskrepanz zwischen der »chemischen« und der theoretisch-physikalischen Auffassung des Molekülbaus. EISTERT (1938 a) schreibt darüber:

Die heutige  
Symbolik.

»Der Experimentalchemiker braucht Formelbilder, die ihm möglichst knappe Beschreibung seiner Versuche gestatten; er geht in seinen Überlegungen vom reagierenden Molekül aus. Der theoretische Physiker befürchtet, dass man aus den Grenzformeln als dem bequemsten Symbol des Chemikers voreilig Energieinhalte »ablesen« will. Vor allem aber: er geht in seinen rechnerischen Ansätzen vom ruhenden Molekül aus, wie es bei den meisten physikalischen Messungen vorliegt. Der Begriff Polarität und Polarisierbarkeit, ohne den der Chemiker nicht auskommt, wurde deshalb von der theoretischen Physik bisher zu wenig beachtet.«

Für manche physiologisch aktiven Verbindungen ist aber die »reaktive« Betrachtungsweise allein nicht genügend. Besonders



gilt dies für solche Verbindungen, deren spezielles Eingreifen nicht auf die reaktive Beteiligung einer bestimmten Gruppe mit resultierender veränderter Elektronenanteiligkeit zurückzuführen ist. In diesen Fällen ist die Raumstruktur des ganzen Moleküls für die »physiologische« Eigenart der betr. Verbindung von besonderer Bedeutung. Im folgenden Überblick der innermolekularen Struktur physiologisch aktiver Verbindungen werden wir uns doch präliminär den Gedankengängen anschliessen, die von dem Zusammenhang zwischen Elektronenverteilung und reaktivem Verhalten ausgehen. Auf eine allgemeinere Darstellung der Theorie der gegenseitigen Beeinflussung verschiedener Atomgruppen muss hier verzichtet werden, weswegen zunächst auf die Sammelwerke von E. HÜCKEL (1937), W. HÜCKEL (1940), EISTERT (1938), PAULING (1940) und RICE (1940) hingewiesen wird. Doch ist hier eine kurze Zusammenfassung der verschiedenen Substituenten-»Effekte« am Platz.

**Substituenteneinfluss und Elektronenverteilung.** Die Verteilung der Elektronen in einem organischen Molekül ist eine Funktion der speziellen Elektronenanteiligkeit jeder einzelnen Atomgruppe. Wird zunächst jede für sich betrachtet, so ist die Verteilung der Elektronen zwischen der betr. Atomgruppe und dem Rest des Moleküls auf den Grad der Elektronegativität der in der betr. Bindung beteiligten Atome zurückzuführen. Dabei muss natürlich auch die Verschiebbarkeit der betr. Elektronen in Rechnung gezogen werden. Im ganzen Molekül liegt somit eine Art Bilanz zwischen den verschiedenen Elektronenbeanspruchungen der Atome vor. Eine örtliche Elektronenverschiebung wird daher eine Rückwirkung auf die Elektronenverteilung in allen Bezirken des Moleküls ausüben. Beim Austausch irgend eines Atoms gegen ein anderes wird die Grösse und Richtung dieser Rückwirkung von der Elektronegativität des hinzutretenden Atoms bestimmt. Besitzt dieses ausserdem noch freie Elektronenpaare, so ist meistens deren spezielle Beweglichkeit auch noch mit in Betracht zu ziehen. Für die speziell elektronenverschiebenden Einflüsse verschiedener Substituenten werden allgemein die Symbole »induktiver und elektromerer Effekt« gebraucht.

Induktiver  
Effekt.

Der *induktive (I-)Effekt* betrifft primär die Verteilung der  $\sigma$ -Elektronen einer Bindung. Beim Austausch des Wasserstoffs einer C—H-Bindung gegen ein Atom von mehr oder weniger elektronegativem Charakter wird zunächst die  $\sigma$ -Elektronenanteiligkeit des angeschlossenen C-Atoms vermindert, bezw. ver-

grössert. Die Tendenz dieser induktiven  $\sigma$ -Elektronenverschiebung auszugleichen, wird sich auf die Nachbaratome übertragen, was weiter zu einer Beeinflussung der  $\sigma$ -Elektronenverteilung im ganzen Molekülgerüst führen wird. Es muss betont werden, dass der hier gebrauchte Begriff Elektronegativität einfach ein Ausdruck für das Vermögen eines Atoms, Elektronen anzuziehen, ist. Diese Elektronegativität, wie sie in relativen Zahlen für verschiedene Atome angegeben ist, ist — wie PAULING (1940 a) sich ausdrückt — »von dem Elektrodenpotential des betr. Elementes und dessen Elektronaffinität zu unterscheiden«. Die Unterschiede der Elektronegativität einiger Elemente können aus nachstehender Tabelle ersehen werden. (PAULING, 1940 b).

H 2.1	S 2.5	Cl 3.0
P 2.1	C 2.5	N 3.0
J 2.5	Br 2.8	O 3.5

Über die Natur der Fortpflanzung des I-Effektes herrscht noch eine gewisse Unklarheit (EISTERT 1938 b). Aus verschiedenen Gründen ist man dazu geneigt, den I-Effekt in zwei Komponenten zu zerlegen. Die eine würde sich von der Störungsstelle aus von Atom zu Atom übertragen. Besonders von seiten der englischen Chemiker ist die Meinung geäußert worden, dass diese Übertragung im Sinne einer abwechselnd verminderten und erhöhten  $\sigma$ -Elektronenanteilitigkeit stattfindet; *alternativ-induktiver* (A-)Effekt. Die andere könnte als eine Art elektrostatischer Raumwirkung angesehen werden, deren Einfluss sich nur über einen gewissen Bezirk erstreckt; *Feld*-(F-)Effekt.

Die Annahme dieser beiden Effekte basiert primär auf experimentellen Beobachtungen der Beeinflussung der Reaktivität angrenzender C-Atome durch eine bestimmte Atomgruppe. In manchen Fällen lässt sich tatsächlich ein »alternativer« Einfluss eines Substituenten beobachten, wie z. B. das oft erwähnte Verhalten der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Chlorbuttersäuren zu Alkali bzw. katalytisch angeregten Wasserstoff. (PAAL und SCHIEDEWITZ, 1929). KOH spaltet hier das  $\beta$ -Cl leicht als Cl<sup>-</sup> ab, das  $\alpha$ -Cl wird schwer angegriffen. Umgekehrt wird das  $\alpha$ -Cl leicht gegen H ausgetauscht, das  $\beta$ -Cl sehr schwierig. Es ist anzunehmen, dass hier die alternative Wirkung von dem stark elektronegativen Carbonylsauerstoff ausgeht, was zu einer verarmten  $\sigma$ -Elektronenanteilitigkeit im Carbonyl-C- und im  $\beta$ -C-Atom, und zu einer erhöhten im  $\alpha$ -C-Atom führt. Über den A-Effekt in aromatischen Verbindungen wird weiter unten berichtet. Der Befund, dass z. B. im Verhältnis zur Buttersäure alle Chlorbuttersäuren grössere Neigung zur Protolyse besitzen, ist dagegen auf den F-Effekt der Cl-Atome zurück-

geführt worden. (Vgl. EISTERT, 1938 c). Hier wird also einfach angenommen, dass die  $\sigma$ -Elektronbeanspruchung der Cl-Atome sich in *nichtalternativer* Weise zum Carboxyl fortpflanzt. Dies wird eine verminderte Negativität im protonanziehenden System, d. h. erhöhte Dissoziationstendenz, bewirken.

Obwohl eine exakte theoretisch-physikalische Begründung der induktiven Beeinflussung der  $\sigma$ -Elektronen noch fehlt, sind doch die beiden A- und F-Effekte als mehr als nur den experimentellen Befunden angepasste Hilfhypothesen anzusehen. Ganz allgemein sind sie für das Voraussagen gewisser Reaktivitätsunterschiede verschiedener Atomgruppen in substituierten Molekülen praktisch recht gut brauchbar. Was als F-Effekt bezeichnet wird steht sicher mit dem polarisierenden Einfluss gewisser symmetrischer Verbindungen — z. B. dem des Tetranitromethan auf sich nähernde Moleküle mit verschiebbaren Elektronen — in engem Zusammenhang.

Elektromerer  
Effekt.

In ungesättigten Systemen muss unter Umständen ausser der induktiven Beeinflussung der verschiedenen  $\sigma$ -Elektronenanteile die Wirkung eines Substituenten auf die  $\pi$ -Elektronenverteilung berücksichtigt werden. Im Gegensatz zu den  $\sigma$ -Elektronen ist bei den beweglicheren  $\pi$ -Elektronen keine streng örtliche Lokalisation anzunehmen. In der wellenmechanischen Behandlung der Benzolstruktur ist z. B. SCHMIDT (1938) von der Voraussetzung ausgegangen, dass die 6  $\pi$ -Elektronen als das kollektive Eigentum aller C-Atome im Ringgerüst anzusehen sind, im Sinne einer Art von  $\pi$ -Elektronen-»Gas« oder »Nebel«. Diese Darstellungsweise gibt eigentlich ein recht zutreffendes Bild von dem molekularen Zustand, wie er durch die Mesomerie zwischen den verschiedenen koexistenten Grenzstrukturen aufzufassen ist. Die Art und Richtung der  $\pi$ -Elektronen-verschiebenden Einwirkung eines Substituenten wird dadurch bestimmt, in welchem Grade der Substituent selbst zu  $\pi$ -Elektronenabgabe, bzw. -aufnahme befähigt ist; *elektromerer Effekt* (*E-Effekt*).

Die *Abgabe* von  $\pi$ -Elektronen setzt das Vorhandensein freier Elektronenpaare im — dem betr. Ring-C-Atom angrenzenden — Substituentenatom voraus. Je nach dem Entkopplungsgrad kann die Anteiligkeit dieser Elektronen im mesomeren System grösser oder geringer sein. Beim Cl- ist sie verhältnismässig klein, beim HO- und H<sub>2</sub>N- ist sie bedeutend mehr ausgeprägt, was sich in erhöhter  $\pi$ -Elektronendichte in 2- und 4-Stellung äussert, + *E-Effekt*. Die *Aufnahme* von  $\pi$ -Elektronen aus dem mesomeren System basiert dagegen auf der Fähigkeit des Substituenten, als Konjugationspartner zu dienen. Die Stärke dieses — *E-Effektes* wird durch die Tendenz des betr. Doppel-

bindungssystems des Substituenten zur  $\pi$ -Elektronenaufnahme bestimmt, »Aufrichtbarkeit« der Doppelbindungen. Der Effekt bewirkt somit eine Verarmung der  $\pi$ -Elektronen im Ring, was sich besonders in 2- und 4-Stellung bemerkbar macht.

Die gebräuchliche Bezeichnungsweise der I- resp. I + E-Einflüsse eines Substituenten kann natürlich nur in groben Zügen die bewirkten Effekte veranschaulichen. Für den induktiven Effekt ist u. a. eine — allerdings provisorische — Symbolik vorgeschlagen worden (ARNDT und EISERT, 1935), die die asymmetrische  $\pi$ -Elektronenverteilung in einer Bindung mit einem fettgedruckten Pfeil,  $\blacktriangleright$  wiedergibt. (Der breitere Teil ist dem elektronegativeren Atom zuzuwenden.)

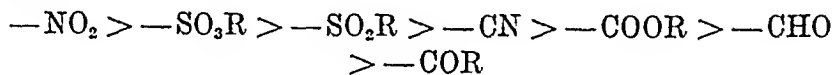
Bezeichnungsweise der I- und E-Effekte.

Für den allgemeinen Feldeffekt fehlt noch eine anschauliche Symbolik. Der E-Effekt wird gewöhnlich durch 2 oder mehrere Grenzstrukturen angegeben, wobei die mesomere Wechselwirkung zwischen diesen durch einen Doppelpfeil  $\longleftrightarrow$  veranschaulicht wird.

Das Zusammenwirken der induktiven und elektromeren Effekte erfolgt sicher nicht rein additiv. Nach den Ausführungen von E. HÜCKEL (1937) bewirkt eine induktive (A-)Verschiebung der  $\sigma$ -Elektronen im Benzol eine Rückwirkung auf die Verteilung der  $\pi$ -Elektronen. Bei monosubstituierten Benzolderivaten wird das Wegziehen von  $\sigma$ -Elektronen vom C-Atom 1 ein Nachziehen von  $\pi$ -Elektronen aus den Stellungen 2 und 4 zur Folge haben, (HÜCKEL, 1940 a). Überhaupt scheint in einem an  $\sigma$ -Elektronen verarmten C-Atom eine Ausgleichungstendenz latent zu liegen, was auf die leicht beweglichen  $\pi$ -Elektronen in der Richtung einwirkt, das Elektronendefizit am betr. Atom aufzuheben. Bei erhöhter  $\sigma$ -Elektronendichte würden sich die  $\pi$ -Elektronen umgekehrt verhalten. Was der heutigen Theorie der organischen Verbindungen zugrunde liegt, ist somit eine Mischung von quantenmechanischen Überlegungen und ein mehr oder weniger gefühlsmässiges Einfügen chemischer Erfahrungstatsachen. Im Ganzen scheint jedoch jene Betrachtungsweise den physikalischen Hintergrund die Substituenteneinflüsse ziemlich gut zu beleuchten, n. b. in dem Masse, wie diese durch Experimente verifiziert werden können. Es muss indessen wiederum betont werden, dass die molekulare Struktur einer Verbindung, wie sie im Normalzustand dargestellt werden kann, nicht als identisch mit der Struktur des reagierenden Moleküls anzusehen ist. Beim Annähern zweier verschiedener Moleküle wird deren »interner«

Zusammenwirken der Effekte.

Polarisierungszustand durch die »externen« Einflüsse der gegenseitigen polaren Anziehung weiter deformiert werden. Bei der Beurteilung des Normalzustandes eines Moleküls sind somit experimentelle Befunde über die Kinetik reaktiver Vorgänge nicht direkt ausschlaggebend. Wenn auch die Art und Stellung einer Gruppe im Molekülgerüst mit den Eigenschaften einer bestimmten Bindung im Nachbargebiet in irgend einem Kausalzusammenhang stehen kann, so lässt sich oft schwer abschätzen, in wieweit der Einfluss dieser Gruppe sich auf die *Polarisiertheit* und die *Polarisierbarkeit* der Struktur verteilt. Die Annahme der I-Effekte in gesättigten Verbindungen ist ein Beispiel hierzu. Zwischen den rel. Elektronegativitäten des Wasserstoffs und des Chlors und den Dissoziationskonstanten von Essig- bzw. Chloressigsäure besteht bestimmt ein Zusammenhang. In der Annahme einer induktiven Wirkung der Cl-Gruppe liegt aber weder eine Aussage über die Natur dieses Wirkungsmechanismus, noch über die der »Festigkeit« der H—O-Bindung im Chloressigsäuremolekül *an sich*. Die Ablösbarkeit des Wasserstoffs als Proton ist doch schliesslich eine Milieufolge und ist u. a. von der Wahl des Lösungsmittels abhängig. Der Austausch eines H-Atoms in Essigsäure gegen Cl- wird nur *die Stärke der Tendenz, den Weg und die Richtung* zu einem speziellen Polarisierungszustand verändern. Was von Wert ist, ist das Vergleichen der induktiven Einflüsse verschiedener, in derselben Stellung in einem Molekül eingekoppelter Atomgruppen. Die folgende Reihe — Stärke des I-Effektes — ist von ARNDT und Mitarbeitern erfahrungsgemäss aufgestellt (ARNDT, SCHOLZ und FROBEL, 1935):

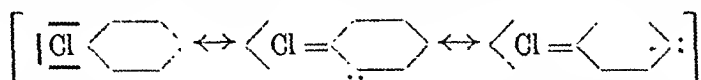


Ob der I-Einfluss von alternativer oder nicht-alternativer Natur ist lässt sich nur von Fall zu Fall entscheiden. Fest steht aber, dass der ganze induktive Effekt primär die  $\sigma$ -Elektronen beeinflusst. Bei der  $\text{CH}_3$ -Gruppe und anderen Alkylen ist der induktive Effekt sicher ziemlich gering und geht wahrscheinlich in derselben Richtung wie beim Halogen.

Beim E-Effekt liegen die Verhältnisse etwas anders. Hier gibt es bei gewissen Systemen eine quantenmechanische Basis für die  $\pi$ -Elektronenverteilung, was zu bestimmten Aussagen über  $\pi$ -Elektronenanteiligkeit der C-Atome und den Doppelbindungsgrad

der C—C-Bindungen führt. Ausserdem ist durch Bestimmung des Bindungsabstandes zwischen einem Substituentenatom und dem angeschlossenen C-Atom auf den Doppelbindungsgrad und damit auf die mesomere Beteiligung der Gruppe zu schliessen. Diese Untersuchungen basieren einerseits auf direkten Messungen der Atomabstände, andererseits auf Dipolmomentmessungen.

Der experimentell gefundene Wert eines Bindungsabstandes C—X gibt beim Vergleichen mit den Extremwerten  $\text{—C—X}$  und  $\text{C=X}$  einen Anhaltspunkt für den Grad von  $\pi$ -Elektronenbeteiligung in der Bindung. Solche Untersuchungen auf Basis von Elektronenstrahlenanalyse sind von PAULING und Mitarbeitern in grosser Zahl gemacht worden und haben z. B. den geringen + E-Effekt der Halogene in Benzol bestätigt. Die Struktur von z. B. Chlorbenzol,



ist schätzungsweise nur zu 15 % in den rechten Grenzformeln enthalten.<sup>1</sup> Siehe z. B. BROCKWAY, BEACH und PAULING (1935).

Weiter geben Untersuchungen über die Verbrennungswärmen gewisse Auskünfte über die *energetische Lage* des Moleküls zwischen zwei mesomeren Grenzzuständen, wodurch eine Beurteilung des Mesomeriegrades ermöglicht wird.

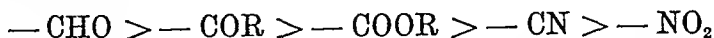
Die verschiedenen Bestimmungen von 2-, 3- und 4-Reaktivität der Wasserstoffatome in monosubstituierten Benzolen sind dagegen für die Auffassung der Moleküle im Normalzustand nur von sekundärer Bedeutung. So ist es noch umstritten, in welcher Weise sich die Einwirkung auf Phenol und Anilin von elektrophilen Agenzien — wie  $\text{HNO}_3$  — vollzieht. Einerseits ist nach der vom Substituentenatom bewirkten induktiven Verarmung der  $\pi$ -Elektronen in 2 und 4 eine erleichterte Ablösbarkeit der H-Atome in diesen Stellungen anzunehmen. Die Substitution würde dabei als ein direkter Austausch  $\text{H} \rightarrow \text{NO}_2$  stattfinden, wobei das Molekül sich im Zustand geringster Energie zwischen den mesomeren Grenzzuständen befinden würde. Andererseits ist die Meinung vertreten, dass bei der Substitution die elektromer auftretenden freien  $\pi$ -Elektronenpaare in 2- und 4-Stellung im Sinne einer Art Additionsreaktion angegriffen werden. Dies würde bedeuten, dass das Molekül im Moment des Reagierens zu dem energiereicheren polaren Grenzzustand »heraufgeschraubt« worden ist. Der Verlauf der Substitutionsvorgänge sagt also über die *Lage* der Phenol- und Anilin-Moleküle im Normalzustand zwischen den verschiedenen Grenzzuständen nichts aus.

Die energetische Basis der Mesomerie.

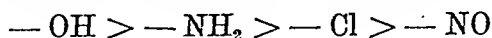
Die relative Stärke der E-Einflüsse verschiedener Substituenten lässt sich somit teils mathematisch-physikalisch, teils empirisch

<sup>1</sup> | und: bezeichnen freie Elektronenpaare. Von den möglichen o-Strukturen ist nur die eine gezeichnet.

risch-chemisch abschätzen. Für die —E-Wirkung ist die Aufrichtbarkeitstendenz des Doppelbindungssystems der Gruppen ausschlaggebend, was aus nachstehender Reihe hervorgeht: (EISTERT 1938 d).



Die + E-Wirkung geht in folgender Richtung:



Die  $\text{CH}_3$ -Gruppe hat wahrscheinlich keine — oder sehr schwache — elektromeren Einflüsse.

Das Übertragen der Anschauungen der heutigen Elektronentheorie über organische Verbindungen auf physiologische Verhältnisse muss, den obigen Betrachtungen gemäss, mit gewissem Vorbehalt ausgeführt werden. Vor allem muss in Betracht gezogen werden, ob eine bestimmte Gruppe an den betr. physiologischen Vorgängen reaktiv beteiligt ist, oder ob die Spezifität des betr. Vorganges in der primären Verankerung des ganzen Molekülgerüsts enthalten ist. In ersterem Fall müssen die Möglichkeiten, dass die Moleküle in verschiedenen polarisierten Grenzzuständen reagieren, in Rechnung gezogen werden und weiter das evt. Vorkommen tautomerer Strukturen. Im zweiten Fall ist eine Betrachtungsweise zu wählen, die mehr den Normalzustand des Moleküls zum Ausdruck bringt. Im folgenden Abschnitt, der die Austauschbarkeit gewisser Teilstrukturen in physiologisch wirksamen Verbindungen behandelt, sollen, soweit es möglich ist, diese Vorsichtsmassnahmen beachtet werden.

Aromatische  
und hetero-  
zyklische  
Ringstruk-  
turen.

**Austausch von Ringstrukturen.** Eine Untersuchung über die Möglichkeiten zum Austausch gewisser Teilstrukturen in physiologisch aktiven Stoffen unter Beibehaltung der speziellen Wirkungen kann auf verschiedenen Wegen unternommen werden. Für den folgenden — allerdings recht schematischen — Überblick ist als Ausgangspunkt die in den verschiedensten Systemen beobachtete gegenseitige Austauschbarkeit gewisser Aromaten- und Heterozykelkerne gewählt worden. Auf nachstehender Tabelle sind einige Typenbeispiele dieser Erscheinungen aus verschiedenen physiologisch-chemischen Gebieten zusammengestellt. (Der Ausdruck »beibehaltene Wirkung« ist hier so zu verstehen, dass die betr. Wirkungen qualitativ dieselben bleiben, allerdings unter der Voraussetzung, dass ihre Intensität höchstens um etwa eine Grössenordnung variiert.)





$E_{\text{Benzol}} = 39 \text{ Kal./Mol}$ , PAULING 1940 c. Übrigens sind die mittleren kinetischen Energien pro  $\pi$ -Elektron im Thiophen und Benzol ziemlich 'gleich'; 12.4 bzw. 11.7 eV. (SCHMIDT 1938).

Das Zurückführen gleichartiger physiologischer Wirkungen von aromatischer und heterozyklischer Verbindungen auf analoge innere Struktur der Ringsysteme scheint sich allmählich in verschiedenen physiologisch-chemischen Kreisen einzubürgern. Besonders hat diese Betrachtungsweise in der Immunochemie Beachtung gefunden. BERGER (1935, 1941), ERLÉNMEYER und BERGER (1932) betonen in ihrer Theorie der immunochemischen Spezifität, dass die ganze Frage der spezifischen Verankerung: Antigene—Antikörper auf der räumlich energetischen Struktur beider Komponenten basiert. Für immunochemisch gleichwertige Antigene führen sie den Begriff »feldähnlich« ein. Dieser Begriff gibt eigentlich ein ausgezeichnetes Bild der Struktur »physiologisch gleichwertiger« Ringsysteme im allgemeinen. Benzol und Thiophen z. B. stellen zwei im Grund feldähnliche Verbindungen dar, weil — unabhängig von der chemischen Zusammensetzung — das »Raumfeld« der potentiellen und der kinetischen Energie der Moleküle gleichartig ist. Nun stammt die Betrachtungsweise von ERLÉNMEYER und BERGER aus experimentellen Untersuchungen über die immunochemische Gleichwertigkeit verschiedener Aryl- und Heterozyklenderivate, die mittels einer Azo-Brücke gewissen Proteinen angeschlossen sind, und weiter aus den Hemmungserscheinungen der Aryl-Azo-Antigen-Antikörperreaktionen durch gewisse Aromaten- und Heterozyklverbindungen. Die Frage ist aber, inwieweit man das Bild des analogen Raumfeldes zweier Ringstrukturen *an sich* auch auf deren Derivate übertragen darf und ob die Betrachtungsweise sich allgemein auf physiologische Reaktionen anwenden lässt. Dies würde aber zwei Annahmen voraussetzen: Erstens wird allgemein angenommen, dass der elektronenverschiebende Einfluss analog angeschlossener Substituenten auf die Polarisiertheit und die Polarisierbarkeit der betr. Systeme gleichwertig ist. Zweitens erwartet man, dass auch die Rückwirkung der betr. Ringsysteme auf die Gruppen gleichwertig sein soll. Aus allgemeinen Beobachtungen der Substituierbarkeit in qualitativer Hinsicht ist zu schliessen, dass die erstere Annahme wenigstens annähernd zutreffend ist. Die Rückwirkung »analoger« Ringsysteme auf die Energetik angeschlossener Substituenten ist dagegen nicht immer übereinstimmend, was z. B. aus der Variation der Dissoziationskonstan-

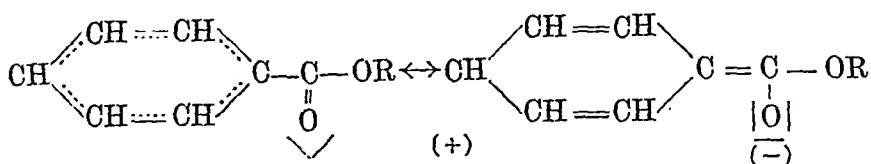
Die »Feldähnlichkeit«.

ten analog gebauter aromatischer und heterozyklischer Carbonsäuren zu ersehen ist.

Für solche physiologisch aktiven Verbindungen, die anscheinend nicht direkt reaktiv in das betr. System eingreifen, scheint also der Begriff der Feldähnlichkeit bei zwei analog gebauten Verbindungen, die gleichartige Wirkung ausüben, ziemlich zutreffend zu sein. Dem analogen immunochemischen Hemmungsvermögen von Benzoesäure und Thiophen-2-Carbonsäure, sowie von 2-Aminopyridin und -Thiazol liegt sicher keine reaktive Beteiligung im Sinne eines Elektronenaustausches zugrunde. Dasselbe kann mit Bestimmtheit von gewissen analog riechenden Benzol- und Thiophenderivaten behauptet werden. Unter den Riechstoffen lässt sich auch für das Auswechseln gewisser Ringsysteme unter Beibehaltung der spez. Wirkung eine ziemlich grosse »Austauschbreite« beobachten. Dithienylmethan, Thienylpyrrylmethan und Thienylphenylmethan besitzen alle den charakteristischen Geruch des Diphenylmethans. Weiter riechen 2-Phenyl-, 2-Furyl-, 2-Thienyl- und 2-Pyrrylbenzthiazol und -selenazol alle gleichartig; BOGERT (1936), BOGERT und STULL (1925), (1927). Es ist aber augenscheinlich, dass bei Verbindungen, denen die spezifische physiologische Wirkung einer bestimmten Wirkungsgruppe zuzuschreiben ist, die Austauschbarkeit zweier Ringsysteme nicht allein auf der analogen Elektronenstruktur der Grundsubstanzen basiert. Eine weitere Anforderung an eine »Ersatzstruktur« ist die, dass die spezielle Beeinflussung auf die Wirkungsgruppe von seiten des ganzen Systems möglichst unverändert beibehalten werden soll. Bei den meisten Verbindungen dieser Art findet man, dass beim Austausch eines Ringsystems gegen ein feldähnliches zwar die charakteristische Wirkung beibehalten ist, aber mit veränderter Intensität. Ein Beispiel zur Beleuchtung dieser Verhältnisse mag hier gegeben werden:

Die lokalanästhetische Wirkung von Diäthylaminoäthylestern gewisser aromatischer und heterozyklischer Carbonsäuren scheint mit irgend einem Zusammenwirken zwischen Ringsystem und Estergruppe in Zusammenhang zu stehen. Von zentraler Bedeutung ist, dass die Estergruppe direkt am Ringsystem angeschlossen ist. Der Benzoesäureester z. B. ist wirksam, die entsprechenden Alkaminester der Phenylessig- und  $\beta$ -Phenylpropionsäure sind unwirksam. Weiter ist die »aromatische« Struktur des Ringsystems ausschlaggebend; die Zyklohexancarbonsäure-

ester üben keine Wirkung aus. Alles deutet darauf hin, dass die spezifische Wirkung mit dem Auftreten polarer Grenzstrukturen verknüpft ist, wie beispielsweise:



Dies wird auch durch die Beobachtungen bestätigt, dass die Wirkungsstärke der Benzoesäureester durch die Einkopplung einer  $\text{—NH}_2$ -Gruppe in p-Stellung erhöht, durch die einer  $\text{—NO}_2$ -Gruppe total ausgelöscht wird. In ersterem Falle wird die Tendenz des Estercarbonyls zur Elektronenaufnahme durch den +E-Effekt der Aminogruppe unterstützt, im zweiten Falle wirkt der —E-Einfluss des  $\text{—NO}_2$  ihr entgegen, was aus den Dissoziationskonstanten der Benzoesäure und deren p-Amino- und p-Nitroderivat zu ersehen ist, (6.8 bzw. 1.2 und  $39.6 \cdot 10^{-5}$ ). Beim Austausch des Benzolringes in Diäthylaminoäthylbenzoat gegen feldähnliche Heterozykelstrukturen zeigt sich jetzt, dass die Wirkungsstärke der Ester ziemlich variierend ist, GILMAN und PICKENS (1925), CATLIN (1935). Siehe die Tabelle:

Diäthylaminoäthylester der:	Lokalanästhetische Wirkungsstärke (in rel. Einheiten)	Dissoziationskonstanten der Säuren
p-Aminobenzoesäure . . . . .	4	$\infty 1.2 \cdot 10^{-5}$
Benzoesäure . . . . .	3	$6.8 \cdot 10^{-5}$
Pyrrol-2-Carbonsäure . . . . .	2	$\infty 20 \cdot 10^{-5}$
Thiophen-2-Carbonsäure . . . . .	1	$34.3 \cdot 10^{-5}$
Furan-2-Carbonsäure . . . . .	$\infty 0$	$75.2 \cdot 10^{-5}$

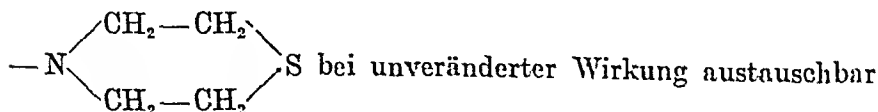
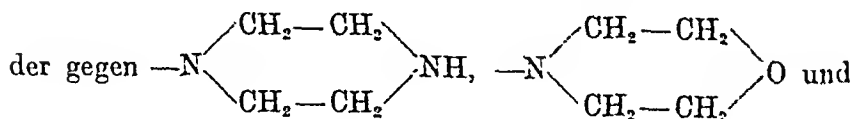
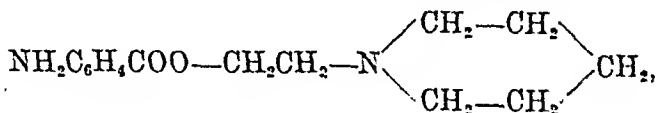
Die physiologische Funktion aromaten-ähnlicher Ringstrukturen.

In diesem Falle kommt also in physiologischer Hinsicht der Pyrrol-2-Carbonsäureester dem entsprechenden Benzoesäureester am nächsten, trotz der bedeutend grösseren Benzolähnlichkeit des Thiophens im Vergleich zu Pyrrol. Ein Vergleich der Dissoziationskonstanten der Säuren macht es jedoch wahrscheinlich, dass die Pyrrol-2-Carbonsäure der Benzoesäure funktionell am ähnlichsten ist, und dass dieses Verhalten für die lokalanästhetische Wirkung der Alkaminester ausschlaggebend ist. Es ist aber weiter zu beachten, dass die lokalanästhetische Wirkung

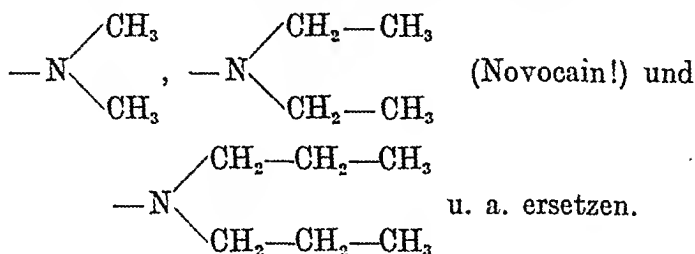


zwar werden hier diejenigen Verbindungen am ähnlichsten wirken, bei denen angeschlossene Substituenten die Elektronenverteilung der betr. Ringstrukturen in möglichst gleichartiger Weise beeinflussen.

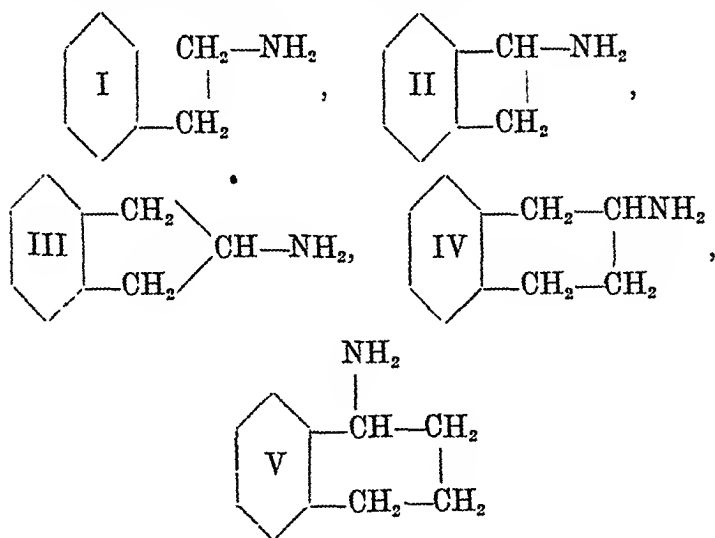
Wenn aber die Wirkung auf eine oder mehrere Wirkungsgruppen zurückgeführt werden kann, so ist die Beeinflussung jener von seiten der Ringsysteme ausschlaggebend. Bei einer Verbindung, die reaktiv-spezifisch in bestimmte Glieder einer physiologischen Reaktionskette eingreift, muss die Energetik der Wirkungsgruppe zwischen bestimmten Grenzbedingungen eingehalten werden. Es kommt hier beim Ringaustausch darauf an, dass die Intensität der I- und E-Einflüsse auf die Wirkungsgruppe möglichst unverändert bleibt, um eine Veränderung der reaktiven Einpassung der Verbindung zu vermeiden. Dies setzt voraus, dass die betr. Ringstrukturen *die Einflüsse angeschlossener Substituenten nach genau gleichwertigen Prinzipien auf die Wirkungsgruppe übertragen müssen*. Die Ringstrukturen müssen sozusagen als gleichwertige Zwischenstrukturen funktionieren, deren Vermögen, den überlagerten elektronenverschiebenden Einfluss verschiedener Gruppen in bestimmte Richtungen zu verteilen, zu einer — qualitativ und quantitativ — analogen Beeinflussung einer speziellen Wirkungsgruppe führen wird. Es ist also nicht allzu überraschend, dass in manchen Fällen eine aromatische oder heterozyklische Ringstruktur durch eine offene Kette mit konjugierten Doppelbindungen ersetzt werden kann, vorausgesetzt, dass die Wirkung der betr. Verbindungen durch die neuartigen Raumstrukturverhältnisse nicht beeinflusst wird. Dasselbe gilt für gewisse totalhydrierte Ringstrukturen. Der Piperidinring in dem stark lokalanästhetisch wirksamen



ist, lässt sich z. B. durch die offenen Strukturen



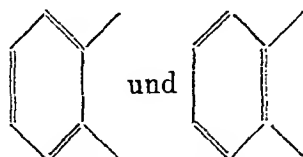
Meist sind natürlich bei chemoselektiven Stoffen aller Art die Verhältnisse nicht so übersichtlich, dass man durch einfache Überlegungen aus deren innerer Struktur schliessen darf, ob eine oder mehrere Wirkungsgruppen vorhanden sind, oder ob das Molekül als Ganzes für die betr. Wirkung verantwortlich ist. Durch die elektrontheoretische Beobachtungsweise lassen sich aber aus dem Zusammenwirken: Substituenten — Zwischenstruktur — Wirkungsgruppe(n) gewisse Schlüsse ziehen. Oft treten bei Verbindungen, bei denen man mit Bestimmtheit eine Wirkungsgruppe annehmen kann, und bei denen anscheinend sterische Verhältnisse von untergeordneter Bedeutung sind gänzlich unerwartete neuartige physiologische Wirkungen auf, wenn nur geringfügige Änderungen im Molekülgerüst vorgenommen werden. Die Literatur der Chemotherapeutika ist voll von solchen Überraschungen. Die Verbindungen



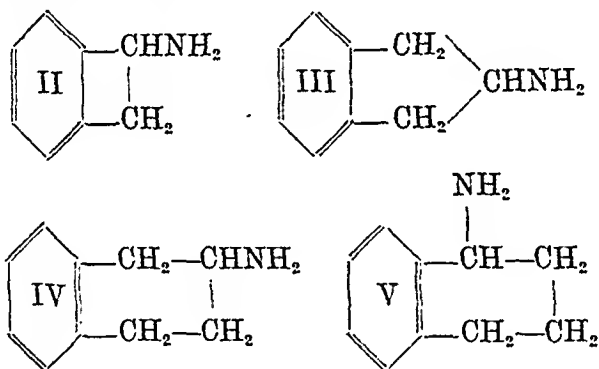
besitzen alle die blutdruckerhöhende Wirkung der Amine, IV und V wirken ausserdem mydriatisch und temperaturerhöhend

(v. BRAUN, GRUBER und KIRSCHBAUM, 1922), was zunächst ziemlich unerklärlich scheint.

Die Ursache liegt hier sicher in dem verschiedenartigen Spannungszustand der an den Benzolring angegliederten hydroaromatischen Ringstrukturen. Die Moleküle werden sich von den möglichen Grenzzuständen:



dem am meisten nähern, der die Lage der geringsten Energie besitzt (Mills-Nixon-Effekt). Die von den Verbindungen II, III, IV und V bevorzugten Grenzzustände können also folgendermaßen veranschaulicht werden:



II und III sind somit im Vergleich zu IV und V *nicht* analog gebaut; die ersteren besitzen einen »gesättigten« Seitenring, die letzteren eine ausgesprochene -en-Struktur, was sicher mit deren speziellem Verhalten in irgend einem Zusammenhang steht. (Vgl. MILLS und NIXON, 1930). Weitere Literatur bei EISTERT (1938 e). Das erwähnte Verhalten von IV und V deutet auf ein Zusammenwirken von Wirkungsgruppe  $\text{—NH}_2$  — und Grundgerüst — in physiologischer Hinsicht — hin, das bei II und III anscheinend fehlt.

**Austausch einzelner Gruppen.** Beim Auswechseln einzelner Atome oder Atomgruppen in physiologisch wirksamen Verbindungen gilt ganz allgemein, dass die neu hinzutretende Atomkombination die speziellen Funktionen der ursprünglichen in analoger Weise übernehmen soll, um den speziellen Wirkungstypus beibehalten zu können. Dies betrifft weiter sekundäre

Faktoren wie Distribution, Anspeicherung am Wirkungsort, Exkretion u. s. w. Selbstverständlich können keine allgemeinen Richtlinien für den Gruppenaustausch an sich gegeben werden, weil Funktion und Bedeutung jeder einzelnen Gruppe für die Wirkung des ganzen Moleküls von Fall zu Fall variieren. Bei manchen Verbindungen hat der erfahrene Chemiker gewissermaßen ein Gefühl dafür, welche Bezirke im Molekül für die physiologische Wirkung überwiegend verantwortlich sind. Weiter bekommt er durch Gruppenaustausch und Einführung von Substituenten einen ungefähren Begriff von den »empfindlichen« und »unempfindlichen« Stellen im Molekül.

Ist z. B. das Vorhandensein einer abgegrenzten Wirkungsgruppe (Elektronenaustausch!) zu vermuten, so ist von vornherein anzunehmen, dass diese oder gewisse Komponenten derselben sich nur unter ganz speziellen Verhältnissen gegen andere Atomkombinationen austauschen lassen. Bei den meisten Eingriffen in die Struktur des Wirkungsbezirks werden Typus und Intensität der betr. Wirkung radikal verändert. Dagegen sind andere im Molekül anwesende Gruppen *nur dort von Bedeutung, wo sie die reaktiven Eigenschaften der Wirkungsgruppe (durch I- bzw. I + E-Effekte) beeinflussen können*. An »unempfindlichen« Stellen eingekoppelt lassen sie sich unter Beibehaltung der Wirkung gegen die verschiedensten Strukturen austauschen. Bei den Extremfällen aber, wo ein abgegrenzter Wirkungsbezirk nicht anzunehmen ist, sondern wo die Wirkung mit der Struktur des ganzen Molekulargerüsts verknüpft zu sein scheint, (»allgemeine Kontaktwirkung«) sind meistens *alle* Atomgruppen der betr. Verbindung sehr umbauempfindlich. Besonders gilt dies für komplizierter gebaute Verbindungen dieser Art (Germanin!), wo Natur und Stellung jeder einzelnen Gruppe für die Wirkung ausschlaggebend sind.

Bei der elektronentheoretischen Betrachtungsweise können mittels Anwendung des Gruppenaustausches als Reagenz der Ausdehnung eines molekularen Wirkungsbezirkes gewisse Aussagen über die physiologischen Eigenschaften der betr. Verbindungen gemacht werden. Erstens lässt sich der Einfluss verschiedener Substituenten auf die reaktiven Eigenschaften einer Wirkungsgruppe und weiter auf die Elektronenstruktur des ganzen Moleküls — wenigstens annähernd — abschätzen. Beim Suchen nach chemotherapeutisch wirksamen Verbindungen einer besonderen Klasse ist somit die Möglichkeit gegeben, die Anzahl

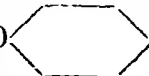


durchzuprüfender Derivate wesentlich zu reduzieren, weil schon von vornherein gewisse Richtlinien des Substituenteneinflusses gegeben sind. Weiter lassen sich in gewissen Fällen aus dem physiologischen Verhalten einer Anzahl von Derivaten auf den Wirkungsmechanismus selbst gewisse Schlüsse ziehen. Einige Beispiele verschiedener Klassen chemoselektiver Verbindungen sollen jetzt kurz besprochen werden, wobei Substituentenwirkung und Umbau in Wirkungsgruppen und im Rest des Moleküls nach obigen Richtlinien analysiert werden. Raumstrukturfaktoren werden hierbei nicht diskutiert, sondern bleiben einer späteren Behandlung vorbehalten.

Gruppen-  
austausch bei  
Riechstoffen.

Bei den Riechstoffen der aromatischen Reihe liegen die Verhältnisse ziemlich einfach. Das hier zugrunde liegende Prinzip scheint das zu sein, dass verschiedene Gruppen, die dieselbe Art von  $\pi$ -Elektronenverschiebung bewirken, in den betr. Verbindungen auch denselben Geruchstypus hervorrufen. In Benzol selbst bewirkt das Einkoppeln von Gruppen mit starkem —E-Effekt ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{CHO}$ ,  $\text{N}_3$  u. a.) das Auftreten von Bittermandelölgeruch. Selbst ein so komplizierter Konjugationspartner wie ein Tetrazolrest wirkt in demselben Sinne; das 2-Phenyltetrazol riecht bittermandelöhlähnlich. Von einer spez. Wirkungsgruppe kann bei jenen Verbindungen nicht die Rede sein. Das gemeinsame der Verbindungen  $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CHO}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_3$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CN}$  u. a. ist einzig und allein *das Vermögen der Seitengruppen im Benzolkern, eine ganz spezielle  $\pi$ -Elektronenverteilung zu bewirken*, vgl. Seite 116. Wird an eine schon substituierte Benzolstruktur eine —E-wirkende Gruppe angeschlossen, so findet man prinzipiell dieselben Verhältnisse wieder.

Interessant ist das Verhalten von  $\text{CH}_3\text{O}$ -substituierten Verbindungen zu —E-wirkenden Gruppen in p-Stellung. Die —E-

Wirkung in z. B.  $\text{CH}_3\text{O}$    $\text{NO}_2$  (Anisduft) wird hier durch einen, allerdings schwachen +E-Effekt des  $\text{CH}_3\text{O}$  — unterstützt, so dass auch Gruppen wie  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$  und  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$  ähnliche Wirkungen wie  $-\text{NO}_2$  und  $-\text{CHO}$  hervorrufen können. Zu dem erwähnten Verhalten der Gruppen sind jedoch einige Ausnahmen zu finden.

Acetophenon und die Benzoesäureester besitzen z. B. nicht den zu erwartenden Bittermandelölgeruch. Wenn überhaupt eine Erklärung hierfür zu geben versucht werden soll, so könnte man zuerst auf das Auftreten eines starken F-Effektes hinweisen (vgl. HÜCKEL (1940 b),

was dem —E-Effekt entgegenwirken würde. Die Nitrierung von Acetophenon greift z. B. hauptsächlich in o- und m- ein. Der Bittermandelölgeruch des p-Methyl-Acetophenon wäre in diesem Sinne als eine »Neutralisation« des Einflusses des carbonylgebundenen Methyls aufzufassen. Vgl. EISTERT (1938 f).

Unter +E-wirkenden Gruppen findet man, dass bei —Cl, —Br, —J, —OCH<sub>3</sub> und —NO, in Benzol eingekoppelt, ein Geruch hervorgerufen wird, der von dem des Benzols nicht allzustark abweicht. Nach obigen Überlegungen könnte man bei diesen Verbindungen eine von den Substituenten wenig polarisierte Benzolstruktur annehmen. In der Tat besitzen die erwähnten Gruppen alle schwache +E-Eigenschaften, was bezüglich der Halogenbenzole u. a. durch BROCKWAY und PALMER (1937) und für Nitrosobenzol durch HAMMICK und ILLINGWORTH (1930) wahrscheinlich gemacht worden ist. Der Unterschied zwischen Nitro- und Nitrosobenzol ist eigentlich ganz typisch. Die NO<sub>2</sub>-Gruppe wirkt als Konjugationspartner, (—E), die NO-Gruppe wirkt infolge des Besitzes eines einsamen Elektronenpaares als (schwacher) +E-Substituent. Der letztere dirigiert z. B. bei Chlorierung nach o- und p-. Im ersten Falle, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>, ist eine starke Verzerrung der  $\pi$ -Elektronenstruktur des Benzols vorhanden, im zweiten Falle, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NO, ist die Struktur wenig gestört. Das Auftreten eines von Benzol abweichenden Geruchstypus (Bittermandel) im ersten Falle und eines mehr benzolähnlichen im zweiten ist mehr als Zufall.

Alkylgruppen (—CH<sub>3</sub>, —C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> u. a.) bewirken aller Wahrscheinlichkeit nach keine elektromeren Elektronenverschiebungen; der Geruch von Toluol, Xylol, Mesitylen und Äthylbenzol ist auch benzolähnlich. Bei Anilin und Phenol herrschen sicherlich spezielle Verhältnisse. Hier ist höchstwahrscheinlich die Wirkung des ganzen Molekülgerüsts auch von einer Spezialwirkung der OH- bzw. NH<sub>2</sub>-Gruppe überlagert. Der analoge Geruchstypus aller aliphatischen Amine deutet darauf hin, dass die NH<sub>2</sub>-Gruppe in den Geruchsrezeptoren eine besondere — wahrscheinlich reaktive — Rolle spielt. Der spezielle »saure« Charakter des Phenol-OH macht auch hier ein reaktives Eingreifen wahrscheinlich. Das Vermögen und die Neigung beider Gruppen zur Wasserstoffbrückenbildung könnte hier mitspielen.

Eine häufig vorkommende Erscheinung ist die, dass Alkylgruppen, besonders CH<sub>3</sub>, gegen Halogenatome ohne Beeinträchtigung der Wirkung ausgetauscht werden können. Dieses Ver-

Austausch  
von Methyl  
gegen  
Halogen.

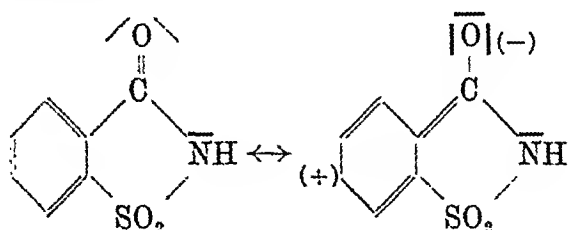
halten kann bei den verschiedensten chemoselektiven Verbindungen beobachtet werden, besonders, wenn die betr. Gruppen direkt an ein aromatisches oder heterozyklisches Ringgerüst angeschlossen sind, betrifft aber auch gewisse Seitenketten und rein aliphatische Strukturen. Voraussetzung ist natürlich, dass das Halogenatom nicht in eine Stellung eintritt, wo ihm und daher dem ganzen Molekül neue reaktive Möglichkeiten geboten werden. ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{COCH}_3 \rightarrow \text{C}_6\text{H}_5\text{COCl}$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} \rightarrow \text{ClCH}_2\text{COOH}$ !) Überhaupt ist die *Stellung* ausschlaggebend. Es ist augenscheinlich, dass der Austausch ohne Wirkungsänderung nur in »unempfindlichen« Bezirken möglich ist, wo die schwache +E-Wirkung der Halogenatome sich nicht besonders bemerkbar macht, und wo vorwiegend induktive Effekte massgebend sind. In Atebrin z. B., wo sich das Cl-Atom in 6-Stellung ohne Wirkungsänderung sogar gegen das —E wirkende —CN austauschen lässt, OESTERLIN (1938 b), ist ein entsprechender Austausch gegen  $\text{CH}_3$  ohne Einfluss auf die spezielle physiologische Qualität der Verbindung, MIETZSCH (1936). Auf Anführung weiterer Beispiele muss hier verzichtet werden. Ein Spezialfall verdient jedoch Beachtung.

Gewisse Alkanole mit einem tertiären C-Atom in der Nachbarsehaft von —OH, die narkotisch wirksam sind, besitzen auch einen ausgesprochenen Kampferduft, vorausgesetzt, dass das tert.-C-Atom und die OH-Gruppe nicht durch mehr als 2 Kohlenstoffatome separiert sind. Ein Beispiel hierfür ist  $(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{CH}_2\text{OH}$ . Es zeigt sich hier, dass die ganze Gruppe  $(\text{CH}_3)_3\text{C}-$  ohne prinzipielle Wirkungsänderung gegen  $\text{Cl}_3\text{C}-$  und  $\text{Br}_3\text{C}-$  austauschbar ist. Die Wirkung ist hier sicherlich auf das spezielle Verhalten des tert.-C-Atoms und dessen Rückwirkung auf die OH-Gruppe zurückzuführen. (Vgl. HÜCKEL 1940 c). Die relative »Unempfindlichkeit« der OH-Gruppe gegen induktive Einflüsse macht es hier möglich, dass die Halogenatome als »Pseudomethyl« funktionieren können. (Die ziemlich gleichartigen räumlichen Verhältnisse der Gruppen  $(\text{CH}_3)_3\text{C}-$ ,  $\text{Cl}_3\text{C}-$  und  $\text{Br}_3\text{C}-$  sind hier sicherlich auch von Bedeutung. Vgl. Seite 119.)

Das Saccharin.

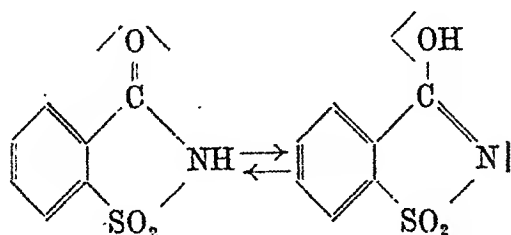
Als Beispiel für Verbindungen, bei denen die Wirkung auf ein spezielles Wirkungsgebiet zurückgeführt werden kann, ist das Saccharin mit seiner —CO—NH—SO<sub>2</sub>-Kette zu erwähnen. Von wesentlicher Bedeutung ist hier die Beeinflussung dieser Seitenkette vom Benzolgerüst aus. Das Aufheben des süßen Geschmak-

kes durch Kernhydrierung weist darauf hin, dass die Süßwirkung mit den Möglichkeiten des Moleküls zur Mesomerie zwischen den Grenzzuständen:



in irgend einem Zusammenhang steht. Dies wird weiter dadurch bestärkt, dass +E-wirkende Gruppen, (Halogene,  $-\text{OCH}_3$ ,  $-\text{NH}_2$ ) in p-Stellung zum  $-\text{CO}-$  eingekoppelt, den süßen Geschmack beibehalten, während  $-E$ -wirkende Gruppen (wie  $-\text{NO}_2$ ) ihn völlig aufheben. Induktiv wirkende Alkylgruppen im Benzolkern üben — wie zu erwarten ist — keinen Einfluss auf die Süßwirkung aus (COHN 1914 c). Andererseits spielt der als Proton leicht abspaltbare Wasserstoff des  $-\text{NH}-$  eine besondere Rolle. Während alle Salze die Süßwirkung — durch den Eigengeschmack der betr. Kationen modifiziert — beibehalten, sind die Verbindungen, bei denen das Wasserstoffatom gegen andere Gruppen ausgetauscht ist, völlig wirkungslos. Durchgeprüft sind z. B. die Saccharine mit den Strukturen  $>\text{NCH}_3$ ,  $>\text{NC}_6\text{H}_5$ ,  $>\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $>\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ ,  $>\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OC}_6\text{H}_5$ ,  $>\text{NCH}_2\text{OH}$ ,  $>\text{NCH}_2\text{COOH}$  und  $>\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$  (p-).

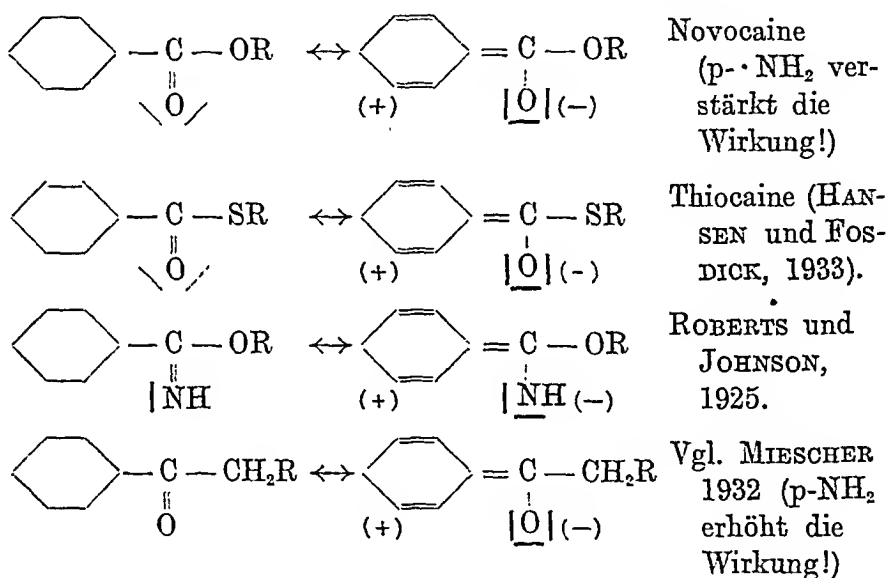
Alles deutet darauf hin, dass die Wirkung auch mit dem tautomerisierbaren System



verknüpft ist. Ein Austausch des  $-\text{CO}-$  gegen die semipolare Anordnung  $-\text{SO}_2-$ , der die Süßwirkung auslöscht, würde auch eine Blockierung der Tautomeriemöglichkeiten bedeuten. Andererseits würde der Austausch von  $-\text{SO}_2-$  gegen  $-\text{CO}-$  (Phtalimid!) zu einer Struktur mit noch verwickelteren Mesomerie- und Tautomeriemöglichkeiten führen. Hier überdeckt wahrschein-

lich die erhöhte Protonbeweglichkeit am N-Atom die Voraussetzungen einer Süsswirkung.

Einige Lokal-  
anaesthetica. Erwähnten lokalanästhetisch wirkenden aromatischen und heterozyklischen Alkaminester. Der Wirkungsbezirk mit seinen speziellen Mesomeriemöglichkeiten kann hier, ohne dass die Wirkung dadurch beeinträchtigt wird, in verschiedener Weise umgebaut werden. Die Voraussetzung ist nur die, dass den betr. Strukturen analoge Möglichkeiten zur Mesomerie geboten werden. In diesem Sinne sind z. B. Verbindungen mit folgenden Grenzstrukturen alle mehr oder weniger lokalanästhetisch wirksam:



Die erwähnten Beispiele veranschaulichen, wie eine Wechselwirkung zwischen einer Wirkungsgruppe — bzw. einem Wirkungs-»bezirk« — und dem Rest des Moleküls zustandekommen kann. Bleibt die spezielle Energetik einer Wirkungsgruppe von anderen Gruppen im Molekülrest unbeeinflusst, so ändert sich in dem physiologischen Verhalten der betr. Verbindungen prinzipiell nichts, wie auch der Mechanismus der Einwirkung auf das physiologische System sein mag. (Von Raumstrukturfaktoren wird hier abgesehen.) Auch in der Wirkungsgruppe selbst kann ein Umbau vollzogen werden, wenn die spezielle Funktion der betr. Struktur dieselbe bleibt.

Man muss jedoch hierbei in Betracht ziehen, dass oft die unveränderte Wirkung einer Verbindung mit »umgebauter« Wirkungsgruppe

auf die Grundsubstanz selbst zurückgeführt werden kann. Die funktionelle Änderung einer Gruppe (Veresterung beim  $-\text{OH}$  z. B.) kann unter Umständen auf dem Weg der Verbindung zum Wirkungsort durch geeignete Agenzien partiell oder vollständig aufgehoben werden. Ein Beispiel hierfür sind die malariciden Mono- und Di-chinin-karbonate, die bei oraler Verabreichung leicht gespalten werden. Das Acetyl- und das Benzoylderivat, die beide schwerer spaltbar sind, besitzen auch eine geringere Wirksamkeit. OESTERLIN (1938 c). Gewisse andere Veränderungen der Wirkungsgruppe des Chinins, in diesem Fall die  $-\text{CHOH}$ -Gruppe, die physiologisch nicht aufgehoben werden können, bewirken dagegen völligen Verlust der malariciden Eigenschaften der betr. Verbindungen, z. B. die entsprechenden  $-\text{CO}$ - und  $-\text{CHCl}$ -Derivate.

**Alkylgruppen und Raumstrukturfaktoren.** Für die Austauschmöglichkeiten der Alkylgruppen und Kohlenwasserstoffstrukturen lassen sich in den meisten Fällen keine allgemeinen Regeln aufstellen. Vom rein elektrontheoretischen Gesichtspunkt aus würde ein Alkyltausch in Bezug auf veränderten induktiven Einfluss durch die betr. Gruppen von geringer Bedeutung sein. Bei manchen Verbindungsklassen kann auch eine ziemlich grosse Variationsmöglichkeit der Struktur eingekoppelter Alkyle beobachtet werden, ohne dass die spezielle physiologische Wirkung der Verbindungen dadurch prinzipiell verändert wird. Alle Glieder der Reihe Methyl- bis Heptylbenzol z. B. riechen nach Benzol, die N-alkylierten Novocaine besitzen alle lokalanästhetische Wirkungen. Wenn sich hier überhaupt ein Einfluss der — an sich geringen — Unterschiede der induktiven Wirkung der Alkylgruppen bemerkbar machen würde, so könnte man gewisse alternative Erscheinungen erwarten. Tatsächlich kann dies bei gewissen Verbindungen mit abgegrenztem Wirkungsbezirk beobachtet werden. Bei den p-Acylaminophenylarsinsäuren mit homologen Acylgruppen ist eine alternierende Toxizität zu beobachten (vgl. FISCHL-SCHLOSSBERGER 1934 b). Solche geringfügigen Wirkungsmodifizierungen sind in grosser Anzahl zu finden und es ist erstaunlich, wie oft in gewissen Systemen eine Kohlenwasserstoffkette — oder -struktur —, als Seitenkette eingekoppelt, unter Beibehaltung des Wirkungstypus modifiziert und umgruppiert werden kann. FOURNEAU hat in Plasmochinderivaten sicherlich 50 Modifikationen des Kohlenwasserstoffgerüsts der Diäthylaminoalkylamino-Kette dargestellt, ohne die malaricide Wirkung der Präparate grundsätzlich zu verändern! Zusammenstellung bei FISCHL-SCHLOSSBERGER (1934 c).

Alternative  
Erscheinungen.

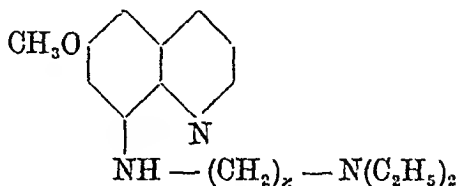
In den meisten Fällen hat man als Erklärung für die Varia-

Beobachtung  
von Raum-  
struktur-  
einflüssen.

tionen der Wirkungsintensität gewisser Alkylderivate verschiedene Distributionsfaktoren (wie Permeierungsvermögen, Lipidlöslichkeit u. s. w.) herangeholt. Es treten jedoch oft Erscheinungen auf, die direkt darauf hindeuten, dass der *räumliche Bau* der betr. Alkylstrukturen selbst von ausschlaggebender Bedeutung ist, abgesehen von Induktiveffekten und Distributionsfaktoren. Schon bei einfachen Methylderivaten sind derartige Verhältnisse zu beobachten.

Beim Einführen eines Methyls in 2-Stellung in 8-Aminoquinolin bleibt die malarieide Wirkung unverändert, erlischt aber, wenn die 6-Stellung weiterhin von einem anderen  $\text{CH}_3$  besetzt wird. Ein anderes allbekanntes Beispiel ist das Verhalten des Laktoflavins, dessen Vitaminwirkung u. a. auf das Vorhandensein der 6- und 7-Methyle zurückzuführen ist. Die 6- und 7-Monomethylderivate sind ebenfalls in dieser Richtung wirksam, nicht aber die 5- und 8-Derivate. Man könnte hier der Vermutung Ausdruck geben, dass die Methylgruppen *teils* durch I-Effekt die spezielle Energetik der resp. Wirkungsgruppen, *teils* durch ihre *räumliche Lage* die Verankerungsmöglichkeiten der betr. Verbindungen beeinflussen.

Bei Verbindungen mit mehratomigen Alkylstrukturen ist der Einfluss der Raumstruktur oft noch augenfälliger. In einer Arbeit von BOVET und ALTMAN (1934) sind Toxizitätsbestimmungen von plasmochinähnlichen Verbindungen in grosser Anzahl gemacht worden. (Versuchstiere waren Kanarien und Reisfinken.) Es zeigte sich dabei, dass die Länge der Seitenkette in der Verbindung:



von erheblichem Einfluss war, siehe Tabelle II.

Bei diesem Beispiel ist sicherlich ein Raumfaktor an der spez. Wirkung beteiligt. Das N-Atom der  $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N}$ -Gruppe hat in allen diesen Fällen dieselbe Möglichkeit, einen I-Effekt durch die Kette zu dem Chinolinkern zu senden, und zwar unabhängig von der Kettenlänge. Jedenfalls ist es unerklärlich, warum die Wirkung sich plötzlich bei  $(-\text{CH}_2-)$  ändert. Eher könnte man ein Alternieren der Wirkung bei schrittweiser Kettenverlängerung

Tabelle II.

Seitenkette	Vogelart	Maximaldosis	Index
$-(CH_2)_2-$	Kanarienvogel	1.5	1:6
$-(CH_2)_3-$	Reisfinken	—	1:37.5
$-(CH_2)_4-$	K	1.35	1:27
$-(CH_2)_5-$	R	0.6	1:100
$-(CH_2)_6-$	K	0.66	1:11
$-(CH_2)_7-$	R	0.16	1:20
$-(CH_2)_8-$	K	0.3	1:30
$-(CH_2)_9-$	R	0.4	1:150
$-(CH_2)_{10}-$	K	—	—
$-(CH_2)_{11}-$	R	0.6	1:150
	K	5.0	1:1000
	R	2.5—3.0	1:166
	K	2.5	1:500
	R	3.5	1:175
	K	3.5	1:700
	R	4.5	1:800
	K	—	—
	R	—	—
	K	2.0	1:100
	R	6.0	1:10

erwarten. Der Sprung beim Übergang von  $-(CH_2)_6-$  zu  $-(CH_2)_7-$  kann jedoch induktiv nicht erklärt werden. Selbst die Annahme eines von der  $N(C_2H_5)_2$ -Gruppe ausgehenden Feldeffektes mit genau begrenzter Reichweite würde als Theorie etwas zu konstruktiv sein.

Das Auftreten sprunghaft veränderter Distributionsmöglichkeiten beim Übergang von der  $-(CH_2)_6-$  zu der  $-(CH_2)_7$ -Verbindung ist auch unwahrscheinlich. Die ganze Erscheinung ist sicherlich ein Raumeffekt der Alkylaminoalkylketten, die dem an sich schwach malariciden 6-Methoxy-8-Aminochinolin verschiedenartig günstige Verankerungsmöglichkeiten bieten.

Ein derartiges Auftreten völlig unregelmässiger Änderungen der physiologischen Wirkung beim Einführen verschiedener Alkyle ist bei manchen Verbindungen vielfach beobachtet worden. Es könnte hier auf die Arbeit von GOODSON, HENRY und MACFIE (1930) über die malariciden Eigenschaften der Chinetinalkylester u. a. hingewiesen werden. Die recht starke Wirkung des Äthylesters wird von der n-Butyl-, n-Amyl- und i-Amylester übertroffen, während der n-Propyl- und der n-Oktylester wirkungslos sind!



Hier ist bestimmt eine Raumwirkung der Alkyle vorhanden. Über ähnliche Erscheinungen bei Riechstoffen siehe Seite 133.

Die Möglichkeiten für eine Raumstrukturanalyse. Die angeführten Typenbeispiele von chemoselektiv-aktiven *Stoffen* haben uns einen Einblick in den gewaltigen Komplex der Spezialprobleme gegeben, die das Gebiet der chemoselektiven *Wirkungen* ausmachen. Die vergleichende Auslese gemeinsamer struktureller Faktoren ermöglicht zwar in gewissen Fällen, eine spezielle Wirkung auf eine bestimmte räumlich energetische Struktur zurückzuführen; aber von dort bis zu einer stichhaltigen Erkenntnis des Wirkungsmechanismus selbst ist noch ein weiter Weg. Die Arbeitsmethodik der Strukturanalyse basiert auf der heutigen Auffassung der Valenz- oder besser Bindungsenergetik mit ihrer experimentellen Unterlage von Studien über Röntgen- und Elektronenstrahlendiffraktion sowie auf kinetischen und thermochemischen Untersuchungen. Um eine genauere Kenntnis der chemoselektiven Wirkungen zu erlangen, müsste man diese Methodik auch auf die den betr. physiologischen Systemen art-eigenen Wirkungspartner anwenden können. In den meisten Fällen sind jedoch diese Wirkungskomponenten (es mag sich um einen oder mehrere handeln) solchen Untersuchungen nicht zugänglich. Nur ganz wenige sind als chemische Individuen isoliert worden, und die, deren inneren Struktur einigermaßen aufgeklärt ist, sind schnell aufgezählt. Bei den allermeisten physiologischen Reaktionen, wie z. B. bei Geruch, Geschmack und den lokalanästhetischen Wirkungen ist man in völliger Unkenntnis über die Natur der Wirkungspartner und sogar über ihre engere Lokalisation in dem betr. System. In günstigen Fällen kann man mit einer gewissen Berechtigung die speziellen Reaktionen einer eng begrenzten Wirkungsgruppe einer chemoselektiv-aktiven Substanz in ein physiologisches Geschehen einordnen, wie z. B. die trypanocide Wirkung verschiedener Arsenderivate und die Styrylehinoline. Die Bestimmung von Redoxpotentialen kann hier über die energetische Beeinflussung einer physiologischen Teilreaktion durch einwirkende Stoffe sowie deren spez. energetische Einpassung im System einigermaßen Aufschluss geben. Das Redoxpotential könnte hier ohne allzugrosse Schwierigkeiten auf eine strukturelle Beeinflussung der spez. Wirkungsgruppe zurückgeführt werden. (Vgl. die Redoxverhältnisse verschiedener substituierter Chirone, HÜCKEL 1940 d.) Die ener-

Die Möglich-  
keiten zur  
Lokalisation  
von Wir-  
kungs-  
gruppen.

getische Einpassung einer Verbindung in irgendeine physiologische Reaktionskette kann weiter in der Richtung des Komponentenaustausches verfolgt werden, wovon die heutige physiologische Methodik mit Erfolg Gebrauch macht. (Beispiel hierzu ist der bekannte Ersatz »physiologischer« Sauerstoffüberträger durch andere Verbindungen mit analoger Wirkung.)

Eine Komponente der chemoselektiven Wirkung ist durch diese Untersuchungsmethodik nicht zu erfassen, nämlich die Bedeutung der *räumlichen Bedingungen* für die betr. Wirkung. Bei einigen Gruppen spezifisch wirkender Substanzen kann dieser Einfluss eine untergeordnete Rolle spielen, bei anderen, und zwar vor allem bei dem Komplex von Substanzen, die im Sinne einer Molekularkontaktwirkung in ein physiologisches Geschehen eingreifen, ist er von allergrösster Bedeutung. Dies trifft bei einem grossen Teil der Verbindungen mit mehratomigen Alkylstrukturen zu und weiter bei allen Verbindungen, die eine optische Asymmetrie aufweisen. Betrachtungen über die Strukturenergetik der betr. Verbindungen reichen hier allein nicht aus, weil hier die Frage der *spezifischen Verankerung* in den Vordergrund tritt. Die Möglichkeiten zur Aufklärung dieser Verhältnisse *in vivo* sind z. Z. ziemlich begrenzt. Obwohl unzählige Beispiele spezifischer Verankerungserscheinungen in physiologischen Systemen — z. B. aus der Enzymchemie — angeführt worden sind, hat sich die Struktur, und zwar besonders die *Oberflächenstruktur* der hochmolekularen Komponenten meist der direkten experimentellen Untersuchung entzogen. Unsere Auffassung von den *intermolekularen Vorgängen* bei den chemoselektiven Erscheinungen ist somit im wahren Sinne des Wortes etwas einseitig.

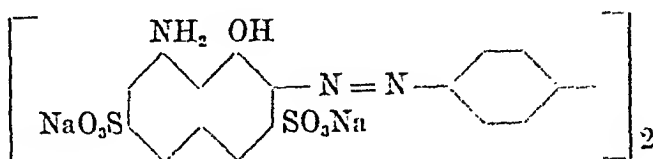
Man ist daher auf Modellversuche angewiesen, insbesondere auf Messungen der Adsorption organischer Stoffe an Strukturen mit genau bekanntem Oberflächengitter. Das Problem greift also in die Theorie der heterogenen Katalyse und speziell in die Erscheinungen der *spezifischen Adsorption* ein. Es sind uns aber sehr wenige Beispiele bekannt, wo man bei der Adsorption einer organischen Substanz von einer spezifischen Anlagerung sprechen kann. Besitzt eine Verbindung einer spez. Klasse das Bindungsvermögen an irgend ein anorganisches Adsorbens, so haben meistens die verschiedensten Homologen und Derivate mehr oder weniger dieselbe Eigenschaft. MARRACK (1938 b) hat jedoch etliche Beispiele für die Adsorption einiger isomerer Farbstoffe an an-

Die Schwierigkeit, die Raumstruktur zu analysieren.

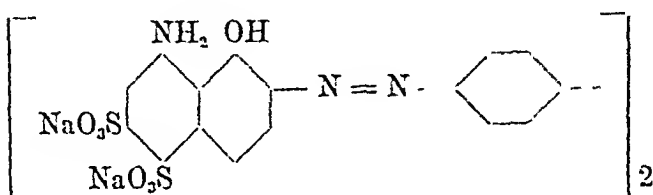
Raumstruktur und spezifische Adsorption.

organische Kristalloberflächen zusammengestellt. Hier ist eine wirkliche Spezifität vorhanden, wie man aus dem Verhalten der beiden Azofarbstoffe:

I.



II.



erschen kann. I wird an Alaunkristalle adsorbiert, während II unbeeinflusst bleibt, was auf die räumliche Anordnung der Sulfogruppen zurückzuführen ist. In diesem Zusammenhang mag man wohl das von v. MÖLLENDORFF (1925) observierte Verhalten der Farbstoffe Gallaminblau und Coelestinblau Kernstrukturen gegenüber zitieren. Diese Verbindungen unterscheiden sich nur in Bezug auf die Gruppen  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$  und  $-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ , und zwar wird die Verbindung mit der letzteren Gruppe an Strukturen verankert, während die  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ -Verbindung nur als allgemeiner »Durchtränkungsfarbstoff« wirkt.

Verfasser dieser Abhandlung ist nun auf den Gedanken gekommen, dass Untersuchungen über Anlagerung, evtl. Adsorption organischer Stoffe an die Phasengrenzflächen organischer Flüssigkeiten/Wasser hier von Wert sein würden. Im Falle einer evtl. auftretenden spezifischen Adsorption könnte man dabei durch geringfügige Änderungen der Struktur des Adsorbates oder Adsorbens (oder beider) zu gewissen Aufschlüssen über den Verankerungsmechanismus gelangen. Diese Untersuchungen haben in das Gebiet der Phasengrenzflächenpotentiale geführt und sind selbstverständlich nur als typische Modellversuche anzusehen, ohne *direkt* auf physiologische Systeme übertragen werden zu können. Im Rahmen der vorangehenden Übersicht über die Strukturfaktoren chemoselektiv-aktiver Verbindungen wäre je-

doch die Besprechung einiger Fälle *raumspezifischer* Adsorption an flüssige Phasengrenzflächen ein gewisses Komplement zu der physikalisch-chemischen Methodik, mit der *gruppenspezifisch* physiologische Reaktionen anzugreifen sind. In nachfolgendem Abschnitt ist der Versuch gemacht worden, die Richtlinien einer Art Raumstrukturanalyse zu geben und einige erworbene Resultate der spezifischen Adsorption mit dem Verhalten der Riechstoffe zusammenzustellen.

---

#### IV.

### Einige experimentelle Untersuchungen der elektrischen Erscheinungen in flüssigen Zwischenflächen.

Über Zwischenflächenstruktur. Die Struktur einer Phasengrenzfläche ist eine Funktion der Kohäsionsverhältnisse beider Phasen. Die Tendenz der gegenwärtigen Auffassung ist die, den Flüssigkeiten eine quasikristallinische Struktur zuzuschreiben, HÜCKEL (1940 e), die im Gegensatz zu den älteren Theorien des ungeordneten, »gasähnlichen« Zustandes steht. Die Kohäsionskräfte in einer Flüssigkeit stehen mit der Molekularstruktur in Zusammenhang und zwar basieren sie nach den älteren Theorien (DEBYE-KEESOM) auf folgenden Grössen: der Polarisierbarkeit  $\alpha$ , dem Quadrupolmoment  $\tau$  und dem Molekulardurchmesser  $\delta$ . Durch die neue quantenmechanische Behandlung von LONDON (1930) ist die weitere Möglichkeit gegeben, zu einem — wenigstens qualitativen — Zusammenhang zwischen Verdampfungswärme und Molekularstruktur zu gelangen. Eine exakt *quantitative* Behandlung des Verhaltens gelöster Stoffe in Flüssigkeiten gibt es bis jetzt nicht. Das Ergebnis aus experimentellen Daten wie u. a. refraktiven Dielektrizitätskonstanten, Parachor, u. s. w. ist eine grösstenteils *qualitative* Erkenntnis der intermolekularen Kräfte.

Die Grenzfläche zwischen irgend einer organischen Flüssigkeit, (in der Folge kurz als »Öl« bezeichnet) und Wasser stellt eine Übergangszone zwischen zwei Lösungen dar: eine Lösung von Öl in Wasser und eine von Wasser in Öl. Dieser Entmischungszustand ist eine Folge der gegenseitigen Lösungsverhältnisse der Phasen. In jeder Lösung eines Stoffes B im Lösungsmittel A besteht eine gewisse Bilanz zwischen den Kohäsionskräften beider Molekülarten. Das Bestreben von Seiten der Moleküle B, sich zu grösserem Molekülverband zusammenzuschliessen, wird von

A grösstenteils abgeschirmt. Das Vermögen eines Lösungsmittels, eine Substanz überhaupt in Lösung zu halten, hängt davon ab, ob die erforderliche Anzahl von Molekülen im Lösungsmittel vorhanden ist, um der Kohäsionstendenz der gelösten Moleküle entgegenwirken zu können. Wird im Lösungsmittel A die Anzahl, d. h. die Konzentration der B-Moleküle über eine gewisse Grenze erhöht, so wird schliesslich die abschirmende Wirkung der A-Moleküle unzureichend sein, das gegenseitige Kohäsionsbestreben der B-Moleküle zu bewältigen; es erfolgt Entmischung. Neuere Untersuchungen weisen jetzt darauf hin, dass die Anordnung der gelösten Moleküle und der des Lösungsmittels nicht eine regellose ist, sondern dass vielmehr die Existenz geordneter »Solvatationskomplexe«, die einer gewissen lockeren Struktur zuzuschreiben ist, wahrscheinlich ist. Diese Komplexbildung ist natürlich von der Natur der zwischenmolekularen Kräfte abhängig. Betr. Mischungen von Flüssigkeiten mit geringem Dipolmoment können die Solvatationsverhältnisse durch die Worte von KYROPOULOS (1939) ziemlich treffend charakterisiert werden:

Die Ursachen  
der Ent-  
mischung.

»The structural characteristics of the individual molecule — its polarizability, geometrical symmetry, intramolecular polarization, its partial permanent moment and their accessibility — determine group formation and the type and strength of association which is comparable to intramolecular polarization and determines the residual fields of force of the groups which are essentially dispersion forces. Group formation results in saturation of dipole forces and decrease of the anisotropy of the group. Group formation means the existence of loose bonds of longer duration in comparison with the 'bonds' of short duration which constitute the measurable cohesion forces.«

In Mischungen von stark polaren Flüssigkeiten ist die Tendenz zur Bildung von Solvatationskomplexen bedeutend stärker, besonders wenn Voraussetzungen zur Wasserstoffbrückenbildung bestehen. Die Bedeutung jener Kräfte für verschiedene Assoziationsphänomene in binären Flüssigkeitsgemischen ist u. A. von GORDY (1939) eingehend besprochen worden. Eine gute Übersicht über die Struktur binärer Flüssigkeitsgemische, insbesondere in Bezug auf innere Reibung, bietet die Arbeit von HARMS, RÖSSLER und WOLF (1938). Die Grenzfläche zwischen zwei flüssigen Phasen, die miteinander im Gleichgewicht stehen, ist somit eine Zone, wo die zwei verschiedenen Typen von Solvatationskomplexen in Kontakt kommen können. In jeder Phase ist die Solvation der anderen an die Grenze der Entmischung getrieben; die Anzahl der gelösten Moleküle ist das maximal

Die gegen-  
seitige  
Solvatation  
in Zwischen-  
flächen.

Erreichbare. In der Übergangszone tritt eine besondere Erscheinung auf, nämlich eine *gegenseitige Solvatation der Phasen*. Um die Lage der geringsten Energie zu erreichen muss die Anordnung der angrenzenden Solvatationskomplexe beider Art so sein, dass jedes Molekül der einen Klasse von einer maximalen Anzahl

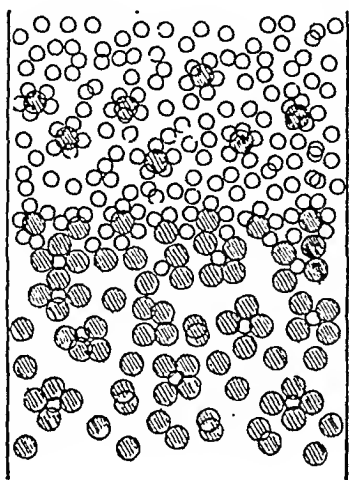


Fig. 1. Schematische Darstellung der Solvatationsverhältnisse in der Grenzfläche zwischen zwei flüssigen Phasen.

von Molekülen der zweiten umgeben wird, was zu einer Art geordneter Struktur führt. Die freien Bewegungsmöglichkeiten der Solvatationskomplexe der beiden Phasen sind also in der Zwischenfläche beträchtlich herabgesetzt. (Vgl. die schematische Fig. 1).

Diese Anordnung der Moleküle in der Zwischenfläche wird durch verschiedenartige Einflüsse gestört und modifiziert. Erstens ist die Anordnung in keiner Weise im statischen Gleichgewicht, sondern die Solvatationskomplexe befinden sich in stetem Austausch, durch thermische Bewegungen im freien Raum der

Die Stabilität  
der Zwischen-  
flächenzone.

Phasen verursacht. Zweitens ist die Zwischenfläche selbst von thermischen Bewegungen durchsetzt. Die Stabilität der Anordnung der Moleküle hängt davon ab, wie die Kräfte der gegenseitigen Solvatation gegen die der thermischen Bewegung ausbalanciert werden. In gewissen Systemen überwiegen die letzteren bei Erhöhung der Temperatur über eine gewisse Grenze, was zum Verschwinden der speziellen Phasengrenzstruktur führt (Phenol/Wasser!). Als stabilisierende Einflüsse sind vor allem die Kräfte zu erwähnen, die bei Dipolmolekülen auftreten und die Bewegungsmöglichkeiten der Moleküle im Sinne einer Orientierung weiter herabsetzen. Dazu kommen die besonderen Verhältnisse bei amin- und hydroxylhaltigen Substanzen, wo die Bindungskräfte der Phasen zueinander von Wasserstoffbrücken unterstützt werden. Weiter muss hier die Art des Eingreifens der engeren Assoziation der Moleküle im System und schliesslich das Verhalten der Ionen in Betracht gezogen werden. Die Verhältnisse im System Öl/Wasser sind also sehr verwickelt, besonders, wenn auch das Verhalten der Ionen in Rechnung ge-

zogen werden soll. Eine direkte Strukturanalyse mit Hilfe von Röntgen- oder Elektronenstrahlen, wie sie mit Erfolg bei der BLODGETT'schen Methodik der polymolekularen Schichten auf Metalloberflächen angewandt worden ist, lässt sich wahrscheinlich schwer auf diesem Gebiete übertragen. Man ist, hier hauptsächlich auf Untersuchungen angewiesen, bei denen aus dem Verhalten der verschiedenen Strukturfaktoren bei Störungen besonderer Art gewisse Schlüsse auf die Struktur gezogen werden können. Solche Untersuchungen sind vor allem:

- 1) *Adsorptionsmessungen* nach der Methodik von GIBBY und ADDISON (1936).
- 2) Messungen der *Zwischenflächenspannung* nach der Kapillarmethode oder mit der Ringwage nach DE NOÛY.
- 3) Messungen der *Emulsionsstabilität*.
- 4) Messungen von *Zwischenflächenpotentialen*.

Von diesen 4 Gebieten wird das letzte im Folgenden besonders besprochen.

**Über Zwischenflächenpotentiale.** Über die älteren Untersuchungen (bis 1928) über Potentiale an den Grenzflächen zwischen organischen Flüssigkeiten und Wasserlösungen gibt CREMER (1928 a) eine ausgezeichnete Übersicht.

Die experimentelle Methodik ist einfach: Das Öl wird mit 2 Wasserphasen im Sinne der schematischen Anordnung Fig. 2 in Kontakt gebracht. Durch 2 unpolarisierte Elektroden ist ein geeignetes Registrierungsgerät an die Wasserphasen angeschlossen, so, dass die Potentialänderungen beim Variieren der Zusammensetzung der einen Lösung gemessen werden können. Die andere Lösung ist meist konstant zu halten und dient als Standard. Die registrierten Potentialvariationen sind also mit den Verhältnissen der einen Grenzfläche verknüpft. (Eine »Absolutmessung« der einzelnen Potentialsprünge an der Grenzflächen ist natürlich unmöglich. Die gesamte Potentialdifferenz der Kette ist die Summe der Potentialsprünge der beiden Grenzflächen.)

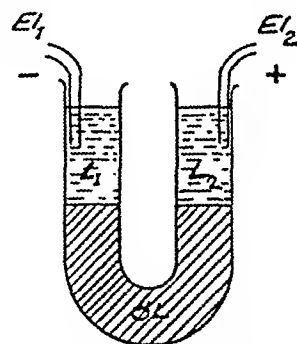


Fig. 2. Eine »Ölzelle«.

Als die zu besprechenden Untersuchungen begonnen wurden (1936), war es von Anfang an klar, dass die damaligen Kenntnisse der Grenzflächenpotentiale im System Öl/Wasserlösungen (»Ölpotentiale«) sehr unzureichend waren. Insbesondere war es

Entwicklung  
der Problem-  
stellung.



dringend nötig, zu einer — wenigstens qualitativen — Auffassung vom Zusammenhang zwischen der Struktur der organischen Verbindungen und der Grenzflächenpotentiale zu gelangen, um die theoretischen Voraussetzungen für das Studium spezifischer Phänomene schaffen zu können. Der Status des Problems, kurz zusammengefasst, war folgender:

Für das Entstehen von Potentialdifferenzen in der Kette: Elektrolytlösung I / Öl / Elektrolytlösung II wurde allgemein die verschiedenartige Verteilung der im System beteiligten Ionenarten verantwortlich gemacht. Das vorwiegende Eindringen positiver Ionen, z. B. in die Ölphase, musste, um Elektronenneutralität aufrecht zu halten, in dem Auftreten einer Potentialdifferenz an der Grenzfläche im Sinne einer elektrischen Doppelschicht resultieren. Die Richtung dieses Potentialsprunges musste demnach so sein, dass das weitere Eindringen der löslicheren positiven Ionen abgebremst wurde. Das Problem wurde also auf rein thermodynamische Basis gestellt. Durch ausführliche Arbeiten von LUTHER (1896), RIESENFELD (1902), CREMER (1906) und BEUTNER (1920) wurde ein grosses Tatsachenmaterial gesammelt, das im Sinne der oben erwähnten Auffassung behandelt wurde. Ausser den Verteilungspotentialen der Grenzflächen wurde innerhalb der Ölphase einer Ölkette ein Diffusionspotential angenommen. In der Arbeit von BEUTNER (1920 a) ist eine ausführliche Zusammenfassung der damaligen Auffassungen des Problems zu finden. Inzwischen wurden von BAUR (1913) gegen die Verteilungstheorie gewisse Einwände erhoben, die auf gänzlich neuen Gedanken basierten. Nach der Auffassung von BAUR war die Ursache des Entstehens von Ölpotentialen in dem verschiedenartigen Adsorptionsvermögen der Ionen an die resp. Grenzflächen zu suchen. Die Schwierigkeit, beweiskräftige Experimente in geeigneten Systemen zu finden, veranlasste jedoch BAUR, nach einer scharfen Polemik mit BEUTNER, der von FREUNDLICH, GYEMANT und MICHAELIS unterstützt wurde, seine Ansicht grösstenteils zu widerrufen. Nach diesem Streit gab es bis 1937 nur noch sehr spärliche experimentelle Beiträge zum Problem der Ölpotentiale. Die Fragestellung war also folgende:

- 1) Ist die Entstehung von Ölpotentialen auf Verteilungsbasis zu erklären oder ist die Adsorptionsauffassung berechtigt?
- 2) Welcher Zusammenhang existiert zwischen Ölpotential

und Molekularstruktur der die Ölphase ausmachenden organischen Verbindungen?

Bei Behandlung der ersteren Frage ist ziemlich früh die Vermutung aufgetaucht, dass die Gegensätze zwischen der Verteilungs- und der Adsorptionstheorie grösstenteils formaler Natur seien. Jede Anschauung basiert schliesslich auf zwei in verschiedener Richtung idealisierten Systemen. In den Fällen, wo definitive Löslichkeit einer gewissen Ionenart in beiden Phasen wirklich vorhanden ist (z. B. Anilinhydrochlorid in Kresol/Wasser), ist das Verteilungsgleichgewicht als Basis des entstehenden Phasengrenzpotentials anzunehmen, vorausgesetzt, dass *keine adsorptive Anreicherung* einer spez. Ionenart an der Grenzfläche stattfindet. Ein solches System kann auf thermodynamische Basis behandelt werden, wie es u. A. in einer Arbeit vom Verfasser und L. G. SILLÉN (1939) geschah. Es ist offensichtlich, dass die Verteilungstheorie grossen Schwierigkeiten begegnet, wenn sie zu einer quantitativen Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment gelangen will. Erstens müssen die verschiedenen Verteilungskoeffizienten der einzelnen Ionen, und zweitens die Aktivitätskoeffizienten für die Ionen in Wasser und in der Ölphase bekannt sein, wobei der Einfachheit halber dieselben Dissoziationsverhältnisse in beiden Phasen vorausgesetzt werden. Weiter ist es wahrscheinlich ziemlich schwer, ein System darzustellen, in dem nicht wenigstens eine Ionenart an der Grenzfläche selbst adsorbierend angereichert wird, was das ganze Gleichgewicht verschieben würde.

Ein idealisiertes Verteilungssystem.

Diese Überlegungen gelten in gewissem Grade auch für ein idealisiertes Adsorptionssystem. Hier ist die Voraussetzung die, dass keine der Ionengattungen in die Ölphase eindringen kann, und dass eine Ionenart bevorzugt an der Grenzfläche selbst adsorbiert wird. Die entsprechenden Gegenionen würden hier eine Art diffuser Doppelschicht im Sinne STERNS (1924) darstellen, was einen Potentialsprung im Grenzflächengebiet zur Folge haben würde. Auch hier ist es schwierig, das ideale System annähernd zu erreichen. Das System Chlorbenzol/Methylenblau-chloridlösungen vom Standpunkt der Adsorption zu behandeln ist vom Verfasser und SILLÉN (loc. cit.) versucht worden. (Die Löslichkeit des Methylenblau-chlorids in Chlorbenzol ist äusserst gering.) Dieser Untersuchung lag der Gedanke zugrunde, dass die Methylenblauionen vom elektrostatischen Feld der Chlorbenzolk-moleküle adsorbiert würden. Es wurde hierbei angenommen,

Ein idealisiertes Adsorptionssystem.

dass die letzteren eine orientierte Schicht darstellten, wobei die als »hydrophil« zu denkende Cl-Gruppe auf die Wasserphase hin gerichtet war. Aus den experimentellen Untersuchungen von

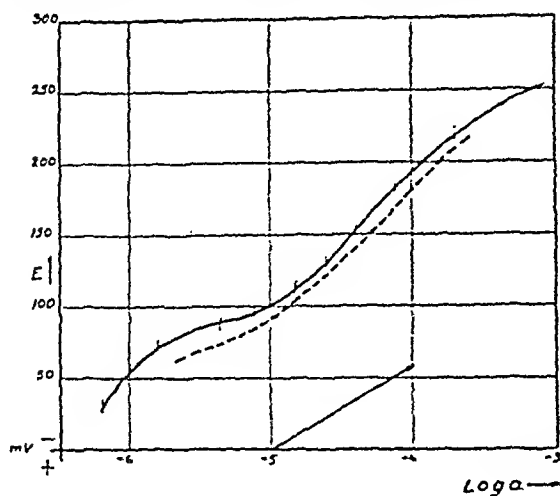


Fig. 3. System: 0.01-n KCl/C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>/0.01-n KCl  
Einwirkung von Methylenblauschlorid. Das Methylen-  
blauschlorid (in 0.01-n KCl-Lösung) wird der Lösung  
II zugeführt.  $a$  = Aktivität. Das Zeichen der Poten-  
tialänderung bezieht sich auf Lösung b. Die theoretische Kurve gestrichelt gezeichnet. (Nach EHRENSVÄRD und SILLÉN, 1939).

GIBBY und ADDISON (1936) über die Adsorption von Methylenblauschlorid an Chlorbenzol und aus den Aktivitätsmessungen von LANGE und HERRE (1938) von Methylenblauschlorid in Wasser wurde der theoretisch zu berechnende Anstieg des Grenzflächenpotentials  $\delta E / \delta \log a$  ( $a$  = Aktivität des Methylenblauschlorids in Wasser) mit experimentellen Werten verglichen. Die Übereinstimmung war bei diesem System ziemlich

gut, (Siehe Fig. 3), was also die Annahme einer adsorptiven Basis für das Grenzflächenpotential in diesem System als berechtigt erscheinen liess.

Für das Auftreten eines *Diffusionspotentials* innerhalb des Öles müssen verschiedenartige Beweglichkeiten der in Öl eingedrungenen Ionen angenommen werden. Das Berechnen dieses Potentials geschieht nach dem Ansatz von HENDERSON (1907). Siehe dazu die Ausführungen von SILLÉN (1939).

Wenn auch in den bisherigen Untersuchungen über Ölpotentiale Systeme gefunden worden sind, bei denen einerseits die Annahme von Verteilungs- und Diffusions-Phänomene, andererseits die einer Adsorption zutreffend ist, so besteht dennoch kein Grund dafür, alle Grenzpotentiale in diphasischen Systemen im Sinne dieser Aufteilung streng abzugrenzen.

Sowohl Ionen-Verteilung und -Diffusion als auch Ionen-Adsorption basieren auf ein und derselben Grundlage, nämlich der Wechselwirkung von Ionen und Neutralkmolekülen. Die Solvatation eines Ions beruht auf der Bildung eines Solvatationskomplexes, der von dem zentralen Ion und einer Anzahl von dieses umgebenden Lösungsmittel-

moleküle zusammengesetzt wird. Die Kräfte, die den Komplex zusammenhalten, sind von Ion-Dipolnatur, ganz gleich, ob die Dipole ein eigenes oder induziertes Moment besitzen. Um das Ion im Solvationskomplex zu halten, müssen diese Kräfte der Tendenz der entgegengesetzt geladenen Ionen, sich gegenseitig anzuziehen, entgegenwirken. Die Solvationsenergie muss die Gitterenergie des Elektrolyten bewältigen können. Auf diese allgemein bekannten Tatsachen soll hier nicht weiter eingegangen werden. GURNEY (1935) gibt eine gute Übersicht über die modernen Lösungstheorien.

Ein durch Ionenadsorption entstehendes Zwischenflächenpotential könnte eigentlich als *Grenzfall* eines Verteilungspotentials angesehen werden. Das bevorzugte Solvatisieren einer speziellen Ionenart in der Ölphase ist hier durch ein bevorzugtes Anziehen einer speziellen Ionenart an die Dipole der Zwischenfläche, die der Wasserphase am nächsten stehen, ersetzt. Bei dem hypothetischen Fall einer völligen Unlöslichkeit der Elektrolyten in der Ölphase würde also eine bevorzugte *Grenzsolvatation* der einen Ionenart entstehen, was zu einem räumlichen Auseinanderrücken der positiven und negativen Ionenladungen führen würde; d. h. es würde eine elektrische Doppelschicht entstehen. Wenn nun die eine Ionenart im Zustande eines Solvationskomplexes an die Zwischenfläche verankert wäre, so würde sich die Gegenionenschicht diffus in der Wasserphase verteilen.

Die verschiedenen Potentialtypen, die im Grenzgebiet zweier nicht mischbarer Flüssigkeiten entstehen können, sind also eigentlich ein und demselben Grundphänomen. Die Unterschiede der Natur der Potentialdifferenzen sind doch letzten Endes in der *örtlichen Lokalisation des Potentialsprunges in der Zwischenflächenzone* zu suchen. Im Falle eines Elektrolyten, der sich in der Ölphase sehr schwer solvatisieren lässt, würde bei bevorzugter Zwischenflächensolvatation (= Adsorption) des einen Iones der Potentialabfall grösstenteils in der Zone der gegenseitigen Solvations lokalisiert sein, um in der Wasserphase schliesslich asymptotisch abzufallen. Sind beide Ionen solvatisierbar, aber in verschiedenem Masse, so wird der Potentialfall in die Ölphase einrücken, um im inneren Diffusionsgebiet stetig abzufallen. Bei jedem Elektrolyten sind aber zweifellos beide Erscheinungen in *mehr oder weniger hohem Grade vorhanden*. Fig. 4 gibt ein — allerdings sehr schematisches — Bild der Verhältnisse.

Zu dem Potentialsprung, der durch das räumliche Auseinanderrücken der beiden Ionenarten entsteht, kommt noch ein Beitrag der in die Übergangszone gerichteten orientierten Dipole.

Der Dipol-  
beitrag.

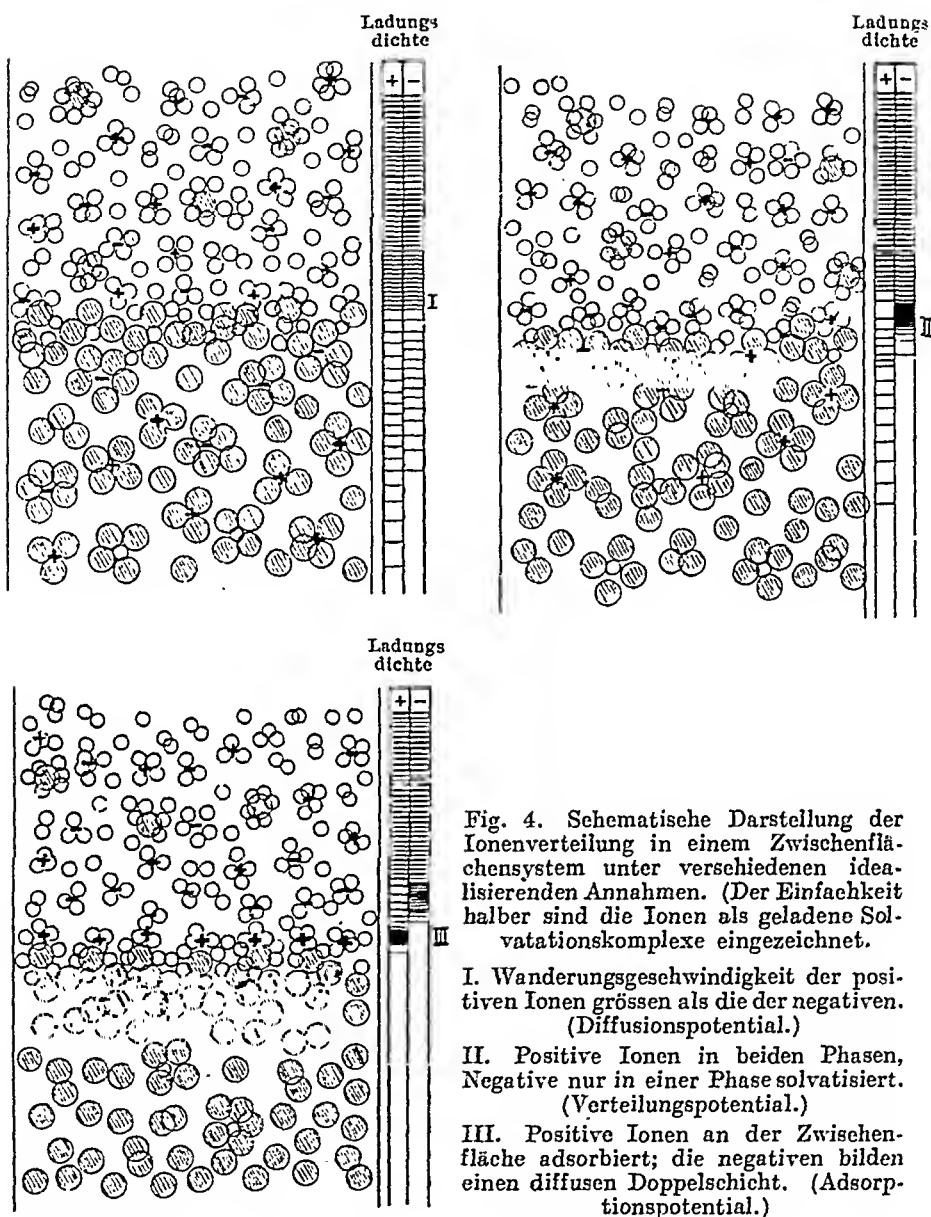


Fig. 4. Schematische Darstellung der Ionenverteilung in einem Zwischenflächensystem unter verschiedenen idealisierenden Annahmen. (Der Einfachheit halber sind die Ionen als geladene Solvationskomplexe eingezeichnet.)

I. Wanderungsgeschwindigkeit der positiven Ionen grösser als die der negativen. (Diffusionspotential.)

II. Positive Ionen in beiden Phasen, Negative nur in einer Phase solvatisiert. (Verteilungspotential.)

III. Positive Ionen an der Zwischenfläche adsorbiert; die negativen bilden eine diffuse Doppelschicht. (Adsorptionspotential.)

Die Bindung verschiedener Ionen wird einen induzierenden Einfluss im Sinne einer Vergrößerung des Totalmomentes des komplexen Dipols haben. Dieser Einfluss auf den Dipolbeitrag des Grenzflächenpotentials ist von der Konzentration der betreffenden Ionen abhängig. Dazu kommt eine Wirkung der freien Wasserdipole, die von deren Anzahl, die mit zunehmender Konzentration der Ionen abnimmt, abhängig ist. Es ist hier angebracht,

die verschiedenen Faktoren, die für das Auftreten eines Grenzflächenpotentials im Übergangsgebiete Öl/Wasser verantwortlich sind, zusammenzustellen:

<i>Beiträge zum Gesamtpotential</i>		<i>Ursache</i>	Eine Übersicht.
$E_A$	Adsorptionsbeitrag	Verschiedenartige Ionensolvatation in der Kontaktzone.	
$E_V$	Verteilungsbeitrag	Verschiedenartige Ionensolvatation in der Ölphase.	
$E_D$	Diffusionsbeitrag	Verschiedenartige Diffusionsgeschwindigkeit der Solvatationskomplexe.	
$E_\mu$	Dipolbeitrag	Gerichtete Orientierung der Öldipole in der Kontaktzone.	
$E_I$	Induktionsbeitrag	Dipolinduktion von seiten angezogener Ionen.	
$E_N$	Neutralisationsbeitrag	Neutralisierung der Dipole von seiten der freien Wasserdipole.	
$E_{AT}$	Austauschbeitrag	Austausch der Öldipole gegen in der Wasserphase gelöste Neutralmoleküle mit oder ohne Dipolmoment.	

Der zuletzt angeführte Beitrag  $E_{AT}$  wird erst aktuell, wenn in der Wasserlösung Neutralmoleküle anwesend sind. Der Einfluss wird sich hier mehr oder weniger auch auf alle anderen Beiträge verteilen.

Ich glaube, dass dieses Schema eine hinreichend umfassende Übersicht über die Komplexe von Faktoren gibt, die für das Auftreten von Zwischenflächenpotentialen verantwortlich sind. Für jedes System Öl/Elektrolytlösung ergibt sich eine spez. Verteilung der verschiedenen Potentialbeiträge. Eine quantitative Gesamtbehandlung der Verhältnisse scheint z. Z. ziemlich ausgeschlossen zu sein, wenn auch die Behandlung sehr einfacher extremer Systeme einigermaßen gelungen ist. (Vgl. EHRENSVÄRD und SILLÉN 1939). Um zu einer, wenn auch präliminären Kenntnis des Einflusses der Molekularstruktur verschiedener »Öle« auf das Zwischenflächenpotential zu gelangen, muss man sich also möglichst einfache Systeme aussuchen. Im folgenden sind die Potentialänderungen der Kette 1-n KCl/Öl/x-n KCl beim Variieren der Konzentration der einen KCl-Lösung gemessen worden. Als »Öl« wurde zunächst eine Anzahl monosubstituierter Benzolderivate gebraucht.

## Der Einfluss anorganischer Elektrolyte.

Die angewandte Methodik war im Prinzip folgende: (Betr. Einzelheiten wird auf Appendix 1, Seite 143 hingewiesen.) Die organischen Flüssigkeiten, die schwerer als Wasser sind, wurden in dem U-förmigen Schenkel (Fig. 5 a), mit einer 1-n KCl-Lösung in Kon-

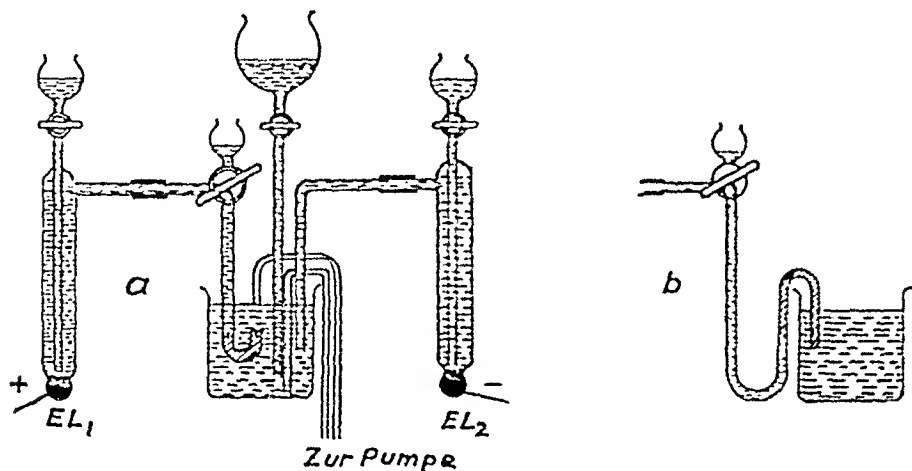


Fig. 5. Apparat zur Messung von Ölpotentialen (schematisiert).  $EL_1$  und  $EL_2$  bezeichnen zwei unpolarisierbare Elektroden (z. B.  $Hg - Hg_2Cl_2 - KCl$ ). Die »zur Pumpe« angeschlossenen Röhren ermöglichen das Absaugen der Lösung bzw. das Halten der Lösungsoberfläche auf konstantem Niveau. Apparat a ist für organische Flüssigkeiten, die schwerer als Wasser sind, zu gebrauchen. Das Öl ist im hakenförmigen Schenkel eingehalten. Apparat b ist für Öle die leichter als Wasser sind, zu gebrauchen.

takt gebracht. Für Flüssigkeiten, die leichter als Wasser sind, wurde eine entsprechende Anordnung (Fig. 5 b) benutzt, wobei der Schenkel als ein  $\Omega$  ausgeführt war.

Die freien Enden des Schenkels mit der freien Grenzfläche des Öls wurden in ein kleines Gefäß mit KCl-Lösung getaucht. Durch die Einfüll- und Absaug-Anordnung wurde das Auswechseln von KCl-Lösungen verschiedener Konzentration ermöglicht. Bei jedem Wechsel der Lösungen wurde das Absaugen und das Nachfüllen bei Konzentrationssteigerung zweimal, bei Konzentrationsverminderung fünfmal wiederholt. Beide KCl-Lösungen waren an 1-n KCl— $Hg_2Cl_2$ — $Hg$ -Elektroden angeschlossen, von denen die, die als Standard gebrauchte 1-n KCl-Lösung enthaltende hochisolierend montiert war. Diese Elektrode war an das Gitter eines Elektrometerrohrengerätes gekoppelt (Siehe Fig. 6), die andere war über eine Kompensationsanordnung der gemeinsamen Erde angeschlossen.

Ein hochisolierter Umkoppler, Um K, ermöglichte eine temporäre Verbindung des einen Gitters mit der Erde; das andere Gitter der ausbalancierten Schaltung war dauernd geerdet. Die Erdung des ersten Gitters diente zur Nullstellung der Anordnung. Die Messung geschah

nach dem gewöhnlichen Kompensationsverfahren mit Nullpunkteinstellung. Beim Beginn einer Messreihe wurde zunächst ins Messgefäß eine 0.00001-n KCl-Lösung eingefüllt und wiederholt ausgewechselt, bis die Potentialdifferenz der Kette sich auf 1—2 mV konstant einstellte, was gewöhnlich nach 3—5 Ausspülungen erreicht war. Dann wurde die Potentialdifferenz abgelesen und die KCl-Lösung gegen eine Lösung höherer Konzentration ausgewechselt. Die neue Potential-

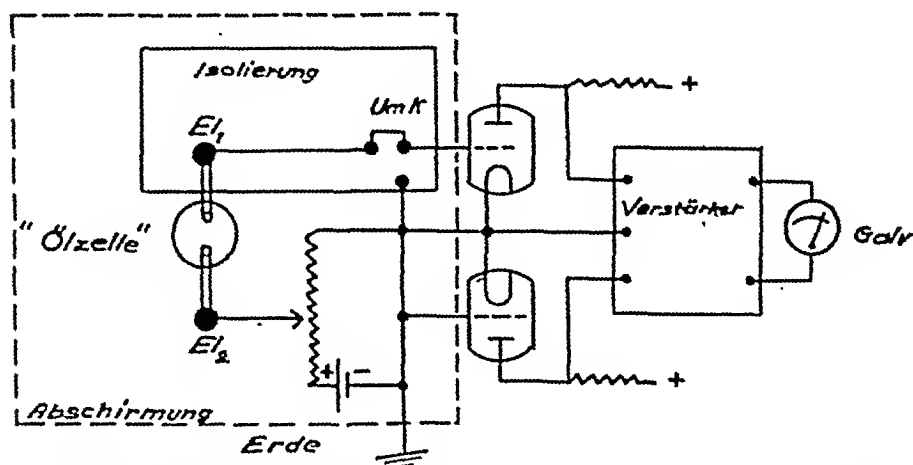


Fig. 6. Schematische Darstellung der Einkopplung der Messanordnung und des Registrierungsgerätes. UmK = Umkoppler, hochisolierend montiert. Galv = Galvanometer.

differenz stellte sich gewöhnlich nach 1—2 maligem Absaugen und Nachfüllen konstant ein. Bei der schliesslich zu erreichenden 1-n KCl-Lösung würde sich theoretisch — infolge der vollständigen Symmetrie — die Potentialdifferenz der Kette gleich Null einstellen. Aus nicht leicht ersichtlichen Gründen trat jedoch hierbei meist eine kleine Asymmetrie der Kette auf (bis  $\pm 5$  mV).

Weil es sich hier um reine Differenzmessungen handelte, wurden, um die einzelnen Messreihen vergleichen zu können, alle Potentialwerte der verschiedenen Konzentrationen mit dem Asymmetriewert der 1-n KCl-Lösung korrigiert. Das Potential des Systems 1-n KCl/Öl/1-n KCl wurde also als Nullpunkt der Messreihe gebraucht. Die weiterhin angegebenen Messwerte sind die Durchschnittswerte von 3—10 Einzelmessungen. Wenn die Übersichtlichkeit der Kurven nicht darunter leidet, werden die Amplituden der Messwertschwankungen als Vertikale, deren Mittelpunkte die Angabe der Mittelwerte darstellen, eingezeichnet.

Die Messungen an den Monoderivaten des Benzols als Ölphase ergaben als Resultat drei verschiedene Typen von  $\delta E / \delta \log c$ -Kurven. Zu den Verbindungen, bei denen das Potential auf

Der KCl-Effekt.



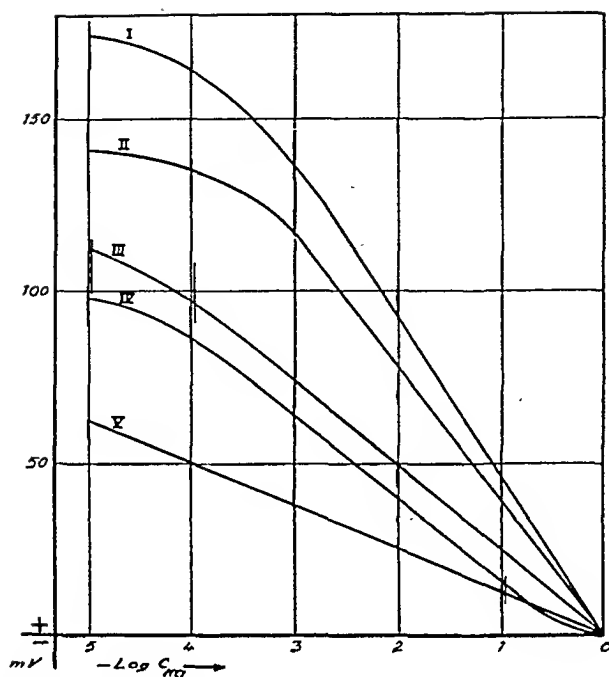


Fig. 7 a. Potentialdifferenzen im System: 1-n KCl/A/x-n KCl; A = I:  $C_6H_5Cl$ , II:  $C_6H_5NO_2$ , III:  $C_6H_5Br$ , IV:  $C_6H_5J$ , V:  $C_6H_5CN$ .

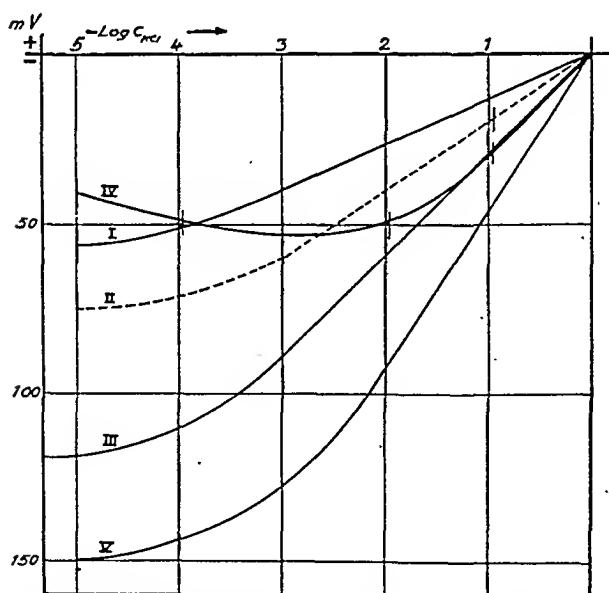


Fig. 7 b. Potentialdifferenzen im System: 1-n KCl/A/x-n KCl; A = einige aromatische Amine; I:  $C_6H_5NH.NH_2$ , (II: Chinolin), III:  $C_6H_5NH_2$ , IV:  $C_6H_5NCS$ , V:  $(CH_3)_2C_6H_3NH_2(1.3.4)$ .

der verdünnteren Seite immer *positiver* wurde, gehörten die Cl-, Br-, J-, CHO-, NO<sub>2</sub>-Derivate. (Fig. 7 a.)

Im Gegensatz hierzu ergaben die —NH<sub>2</sub> und —NH—NH<sub>2</sub>-Verbindungen *negative* Potentialwerte auf der verdünnteren Seite. (Fig. 7 b.) Phenole und Phenylalkanole standen in einer Mittelstellung; das Potential fiel zuerst negativ ab, ging durch ein Minimum und stieg nachher in positiver Richtung (Fig. 7 c).

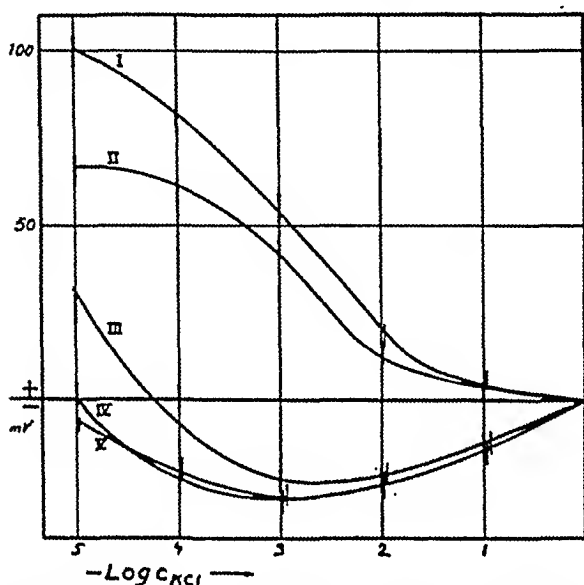


Fig. 7 c. Potentialdifferenzen im System: 1-n KCl/A/x-nKCl; A = einige aromatische OH-Verbindungen; I: CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH (1-2), II: C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH, III: C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>OH, IV: C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, V: C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH.

Die Kurven der ersten beiden Klassen verliefen im Mittelgebiet (Konz. 0.001—0.1-n) ziemlich gradlinig. Die Ursache des verschiedenen Verhaltens der Verbindungen ist, wie auf Seite 63 betont worden ist, in den Ion-Dipol-Bindungsverhältnissen zu suchen. Es ist anzunehmen, dass die orientierten Dipolen für die Bindung der Ionen verantwortlich sind, und zwar in der Richtung, dass negative Gruppen die K<sup>+</sup>—Ionen, positive die Cl<sup>-</sup>—Ionen bevorzugt anziehen.

Man muss sich aber klarmachen, was hier eigentlich unter negativen oder positiven Gruppen zu verstehen ist. Aus der Besprechung der Substituenteneinflüsse auf die Elektronenverteilung des Benzols (Seite 34) geht hervor, dass —Cl, —Br, —J und —NH<sub>2</sub> einen +E-Effekt, —NO<sub>2</sub>, —CHO aber einen —E-Effekt bewirken, was zu in entgegengesetzten Richtungen polarisierten Struk-

turen führt. Die Halogenbenzole neigen also zu einem — wenn auch schwachen — »anilinähnlichen« Polarisierungszustand im Sinne einer »Positivierung« der Halogengruppe. Wenn nun die Ionenbindung allein auf dem Polarisierungszustand basieren würde, so würde man ein analoges Verhalten der Halogenbenzole und des Anilins in der Richtung eines Anziehungsvermögens negativer Ionen erwarten. Es besteht aber hier zwischen diesen Substituenten ein fundamentaler Unterschied. Die polarisierte Struktur des Anilins entsteht durch die Beteiligung des *einzigsten* freien Elektronenpaares des N-Atoms im mesomeren System des Benzolringes, was zu einem *Überschuss* positiver Ladung beim N-Atom führt. Bei den Halogenbenzolen besteht zwar auch die Tendenz zur mesomeren Beteiligung eines Elektronenpaares, es bleiben noch zwei freie Elektronenpaare am Halogēnatom zurück. Die Natur der Halogengruppe bleibt somit fortwährend überwiegend »negativ«, was aus den entgegengesetzten Dipolmomenten des Anilins und Halogenbenzols zu ersehen ist. Es ist also höchstwahrscheinlich, dass die Aminogruppe Anionen, die Halogengruppe Kationen bindet. Die Natur der —E-wirkenden —NO<sub>2</sub> und —CHO ist selbstverständlich kationenbindend.

Diffusion?  
Verteilung?  
Adsorption?

Die Frage ist zunächst, ob das Asymmetriepotential der Kette ein Fall von Adsorptions-, Verteilungs-, oder Diffusionspotential ist. Die Reversibilität der Kettenpotentiale und die geringe Hysterisis, (Siehe Fig. 8 a) lassen vermuten, dass die resp. Ionen nicht weit in die Ölphase eingedrungen sind, was die Annahme einer grösseren Beteiligung von Diffusionseffekten wenig wahrscheinlich macht.

Es bleiben also Adsorption und Verteilungseffekte übrig. Trotzdem die beiden Phasen der untersuchten Systeme nicht zum Gleichgewicht geschüttelt waren, ist hier die Grenzflächenstruktur mit der eines Systems in Gleichgewicht direkt zu vergleichen, weil in beiden Fällen die Möglichkeit zu derselben *räumlichen Anordnung der Moleküle beider Phasen in der Übergangszone besteht, unabhängig davon, wie die Solvationsverhältnisse im Inneren der beiden Phasen sind*. Die gegenseitige Solvation der beiden Phasen ist in beiden Fällen in der Übergangszone zu demselben Grenzzustand getrieben worden, indem die Anzahl solvatisierender Moleküle jeder Art ein Minimum darstellt (Vgl. Seite 58). Der prinzipielle Unterschied zwischen den beiden Zuständen ist jedoch der, dass in dem System, wo kein Gleichgewicht zwischen den beiden Phasen *als solchen* besteht, die Grenzflächen-

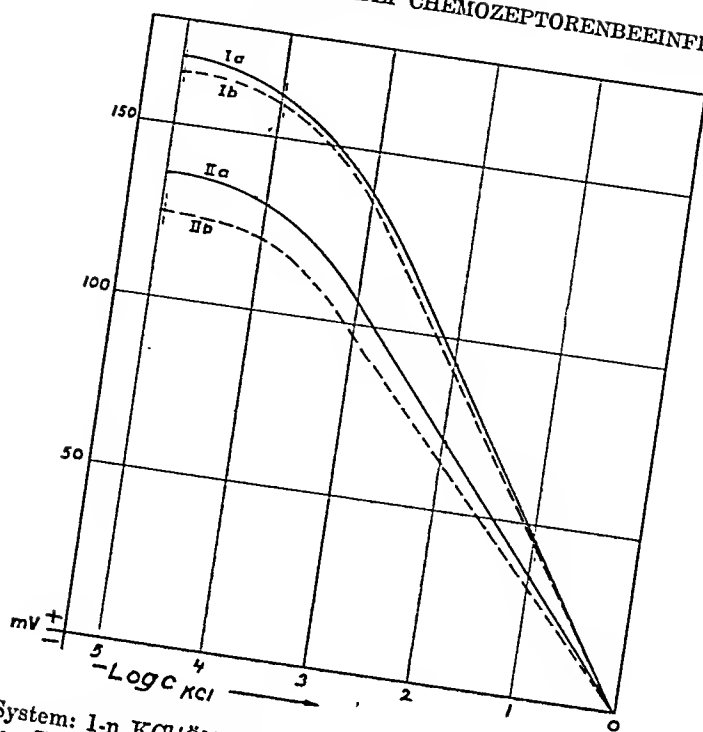


Fig. 8 a. System: 1-n KCl/Öl/x-n KCl. Gezogene Kurven: Potentialänderungen bei erhöhter KCl-Konzentration, gestrichelte die bei absinkender; I:  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$ , II:  $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ .

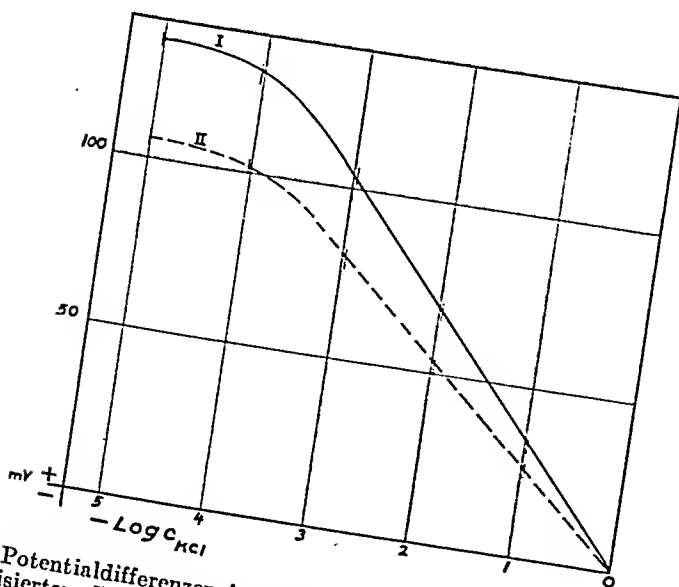


Fig. 8 b. Potentialdifferenzen im System: 1-n KCl/ $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ /x-n KCl. Einfluss von solvatisiertem Wasser; I: Trockenes  $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ , II:  $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$  mit Wasser zum Gleichgewicht geschüttelt.

struktur durch die Einwirkung einer stetigen Diffusion von Molekülen beider Phasen in entgegengesetzten Richtungen beeinflusst werden kann. Hier ist nun die Frage, ob diese Diffusion die Grenzstruktur verzerrt oder ob das Penetrieren der Zone sich *austauschgemäss* vollzieht. Die beiden Kurven Fig. 8 b geben gewissermassen eine Antwort hierauf. Sie stellen den KCl-Effekt des Systems Nitrobenzol-Wasser dar, wo die Ölphase teils mit Wasser zum Gleichgewicht geschüttelt worden ist, (Kurve II), teils einfach mit der Wasserlösung in Kontakt gebracht worden ist. Der analoge Verlauf der Kurven deutet darauf hin, dass wenigstens gleichartige Strukturverhältnisse in den Grenzflächen beider Systeme vorhanden sein können.

Bei den Aminen werden vorwiegend die Cl<sup>-</sup>-Ionen durch Wirkung seitens der positiven NH<sub>2</sub>-Gruppe in der Ölphase angereichert. Die gegenseitige Anziehung ist hier nicht nur auf Ion-Dipolkräfte zurückzuführen, sondern ist sicher von Ion-Ion-Kräften im Sinne einer Art lokalisierter Salzbildung überlagert. Die Reichweite dieser Kräfte müsste also grösser sein als die der Ion-Dipolkräfte, weil die ersteren mit  $1/\delta^2$ , die letzteren mit  $1/\delta^3$  abfallen ( $\delta$  = der mittlere Abstand der Ladungen).

Die folgenden Versuche über substituierte Aniline zeigen auch den überwiegenden Einfluss der Aminogruppe im Vergleich zu anderen Substituenten (—Cl und —OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>). Siehe Fig. 9.

Der spezielle Typus der  $\delta E/\delta \log c$ -Kurven, der beim Phenol auftritt, ist schwerer zu erklären. Dieser Kurventypus scheint jedoch anderen Monooxyverbindungen irgendwie eigen zu sein, was aus Fig. 7 c zu ersehen ist, wo die Kurven der KCl-Effekte der Benzyl-, Phenyläthyl- und Phenylpropyl-Alkohole mit denen des Phenols zusammengestellt sind. Der bedeutend herabgesetzte Effekt im Verhältnis zu dem elektronstrukturanalogen Chlorbenzol ist hier sicher einer Assoziation zuzuschreiben, die eine verminderte Differenz der Solvatationstendenz der K<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Ionen bewirkt. In derselben Richtung könnte die Beteiligung von Wasserstoffbrücken bei der gegenseitigen Solvatation in der Kontaktzone wirken.

Die angeführten Versuche über den KCl-Effekt ergeben eigentlich nichts Unerwartetes. Die Natur der Substituenten steht in ziemlich einleuchtendem Zusammenhang mit den  $\delta E/\log c$ -Kurven. Die Annahme, dass die negativen Gruppen —Cl, —Br, —J, —NO<sub>2</sub> und —CHO vorwiegend positive, die —NH<sub>2</sub>-Gruppe vorwiegend negative Ionen solvatisierend binden, ist aus dem

Zusammenfassung der Ergebnisse beim KCl-Effekt.

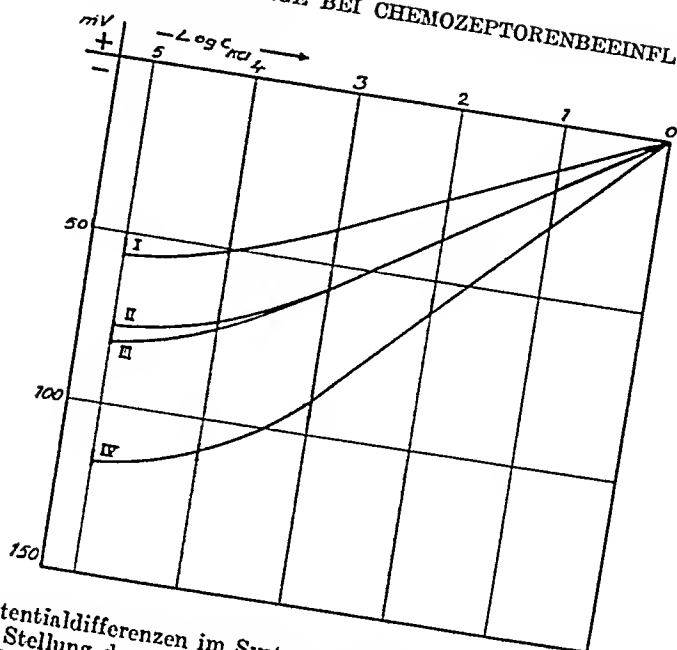


Fig. 9 a. Potentialdifferenzen im System: 1-n KCl/A/x-n KCl. A =  $C_6H_4NH_2$ . Einfluss der Stellung der Cl-Atome; I: o-, II: m-, III: p-, (IV: unsubstituiertes Anilin). (Die p-Verbindung war in untergeköhltem Zustande gemessen.)

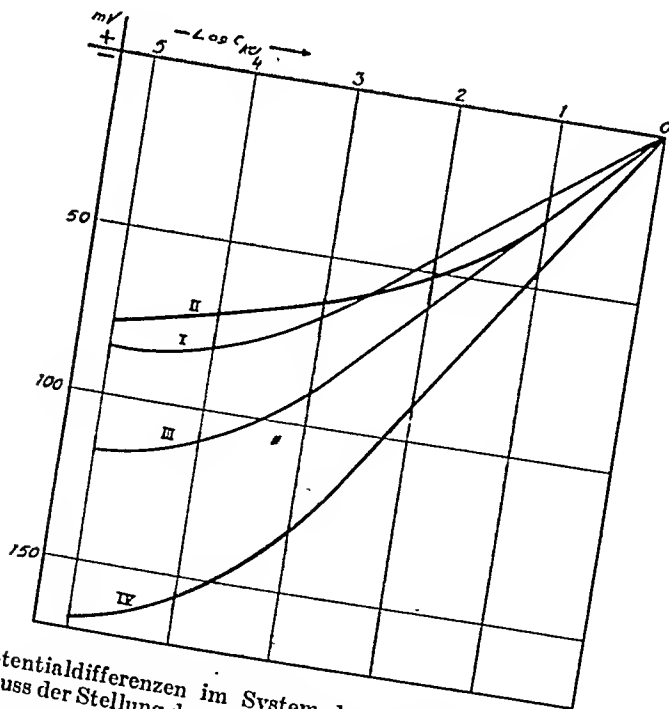


Fig. 9 b. Potentialdifferenzen im System 1-n KCl/A/x-n KCl. A =  $C_6H_4OC_2H_5$ . Einfluss der Stellung der  $C_2H_5O$ -Gruppe; I: p-, II: o-, (III: unsubstituiertes Anilin), IV: m-.

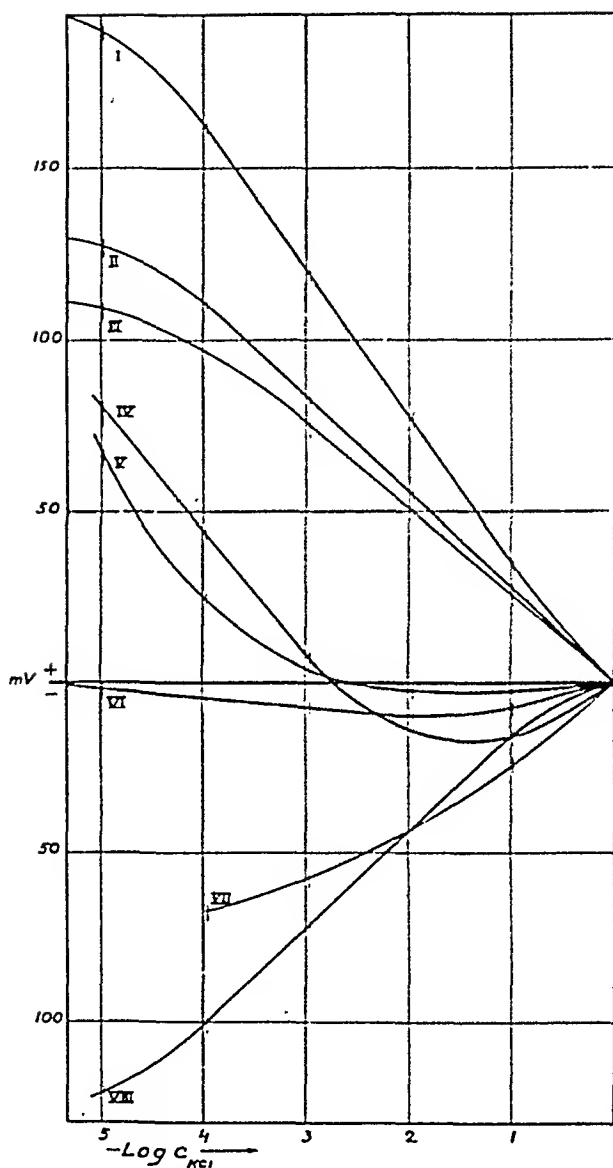


Fig. 10. Potentialdifferenzen im System: 1-n KCl/A/x-n KCl. A = einige aliphatische Verbindungen; I:  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{Cl}$ , (II: Zyklohexanon), III:  $\text{n-C}_6\text{H}_{13}\text{COCH}_3$ , IV:  $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{CN}$ , V:  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CHO}$ , VI:  $\text{i-C}_7\text{H}_{15}\text{OH}$ , VII:  $\text{n-C}_6\text{H}_{13}\text{OH}$ , VIII:  $\text{n-C}_8\text{H}_{17}\text{NH}_2$ .

Verlauf der Kurven ersichtlich. Ein Vergleich mit BEUTNERS »sauren« und »basischen« Ölen ist hier am Platz. BEUTNER (1920 b) hat mit Kresol und o-Toluidin KCl-Effekte erzielt, die in derselben Richtung verlaufen wie die obigen Versuche mit Phenol und Anilin. Die Ursache wurde von BEUTNER als eine »Salz-

bildung« gedeutet, was vielleicht im Falle der Halogenbenzole nicht ganz zutreffend ist.

Der KCl-Effekt bei den Aliphaten stimmt in seiner Richtung mit dem der Benzolderivate überein. Die folgenden Kurven (Fig. 10) zeigen einige Typenbeispiele.

Die ausgeprägte Bedeutung der Aminogruppe für das Entstehen des KCl-effektes bei aromatischen Aminen (Vgl Fig. 9) ist auch bei den aliphatischen Aminen Vorhanden.

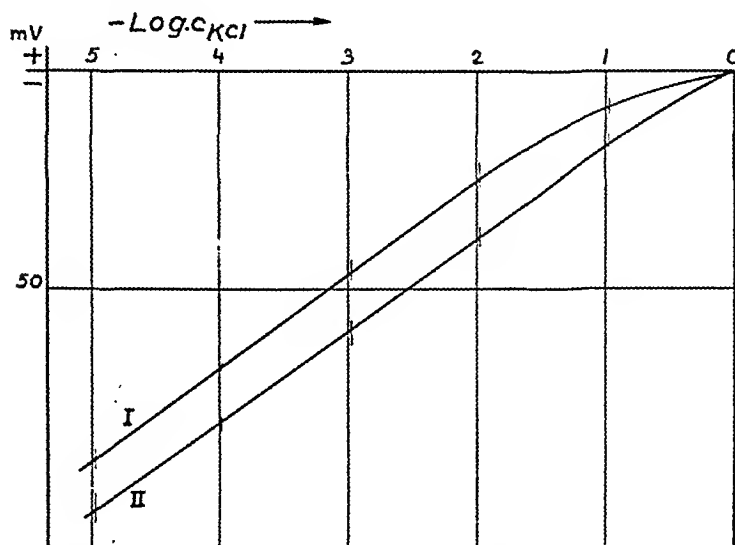


Fig. 11. Potentialdifferenzen im System: 1-n KCl/A/x-n KCl. A =  $n\text{-C}_8\text{H}_{17}\text{NH}_2$  mit 0.01-n KCl zu Gleichgewicht geschüttelt, I: 10 % Kasein in Amin gelöst. II: ohne Kasein.

n-Oktylamin hat das Vermögen, gewisse Proteine als salzartige Verbindungen zu lösen. (Es können sogar Proteine aus einer Wasserlösung mit dem Amin ausgeschüttelt werden.) Der KCl-Effekt einer 10 % Kaseinlösung in Oktylamin wurde gemessen und mit dem KCl-Effekt des reinen Amins verglichen, Fig. 11.

Das Resultat war die Feststellung, dass zwischen den beiden Effekten kein wesentlicher Unterschied bestand. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass hier die in der Ölphase gelöste Fremdschubstanz keinen Einfluss auf die gegenseitige Solvatation in der Kontaktzone ausübt, und dass auch die Differenz der Solvatation der  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ionen unbeeinflusst bleibt. Ein zu 10 % mit Phenylldiazo-Kasein gesättigtes Oktylamin zeigte dasselbe Verhalten.



## Der Jodeffekt.

In der Arbeit von EHRENSVÄRD und SILLÉN (1938) wurde vorläufig über einen Effekt von Jod auf Zwischenflächenpotentiale in gewissen Öl/Wasser-Systemen berichtet. (Vgl. weiter EHRENSVÄRD und SILLÉN, 1939.) Wird in der Kette 0.01-n KCl/Öl/0.01-n KCl der einen KCl-Lösung eine gewisse Menge Jod zugeführt, so wird diese Lösung, auch bei sehr geringer Jodkonzentration, im Verhältnis zu der reinen KCl-Lösung stark positiv.

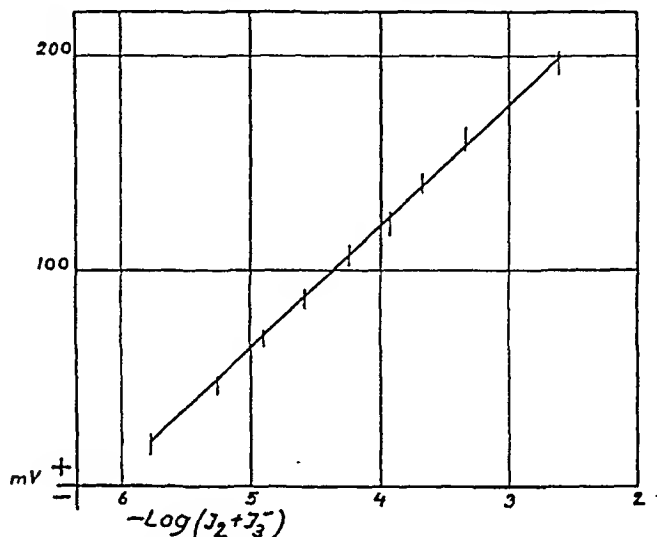


Fig. 12. System: 0.01<sup>a</sup>-n KCl/C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>/0.01<sup>b</sup>-n KCl. Einfluss von J<sub>2</sub>. Das Jod wird in 0.01 KCl-Lösung der Lösung b zugeführt. Das Zeichen der Potentialänderung bezieht sich auf Lösung b. (Nach EHRENSVÄRD und SILLÉN 1939).

Der Effekt kann bis zu + 200 mV ansteigen (Siehe Fig. 12) und ist ziemlich unabhängig davon, ob das Jod in reiner Wasserlösung, in KJ-Lösung oder in Alkohollösung zugeführt wird. (Beim Messen des J<sub>2</sub>-KJ-Effektes musste natürlich der Verteilungsbeitrag von KJ abgerechnet werden.) Die Frage war hier, ob man mit der Wirkung des freien J<sub>2</sub> oder mit J<sub>3</sub><sup>-</sup> — oder sogar Cl<sub>2</sub>J-Ionen — zu rechnen hatte. Da die Wirkung bei verringerter KCl-Konzentration in beiden Wasserphasen anstieg, um in der symmetrischen Kette: dest. H<sub>2</sub>O/Öl/dest. H<sub>2</sub>O + J<sub>2</sub> maximal zu werden, ist sie wahrscheinlich dem freien J<sub>2</sub> zuzuschreiben. Es ergab sich, dass der Effekt nur bei Ölen mit »negativen« Dipolen auftauchte; bei den Aminen wurde niemals ein entsprechender negativer Effekt beobachtet, vielmehr trat hier ein schwa-



des KCl in Chlorbenzol im Verhältnis zu der in Nitrobenzol macht hier eine reine Grenzflächenadsorption der Ionen wahrscheinlich. Die Einlagerung von  $J_2$ -Molekülen in der Kontaktzone müsste also das Grenzflächenpotential beim System Chlorbenzol/KCl-Lösung bedeutend mehr beeinflussen als bei dem gleichen,

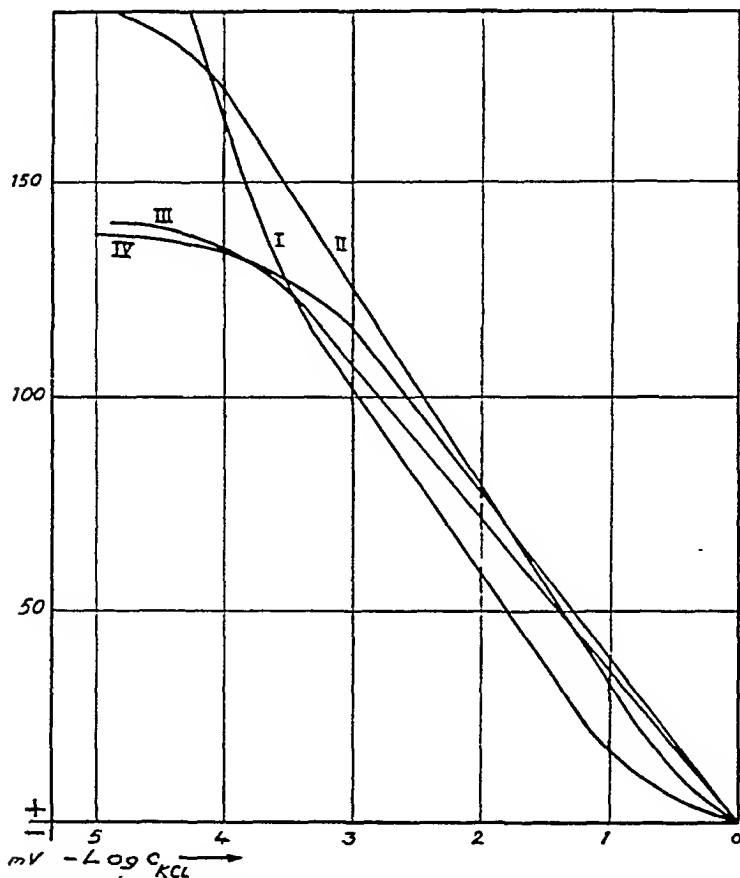


Fig. 14 a. System: 1-n KCl/ $C_6H_5NO_2$  (+  $J_2$ )/x-n KCl. Einfluss von in der Ölphase gelöstem  $J_2$  auf die von KCl-Konzentrationsänderungen bewirkten Potentialdifferenzen im System. I: 5 %, II: 1 %, III: 0.2 %. IV: 0 %  $J_2$ .

teilweise vom Verteilungsphänomen zusammengestellten Effekt bei Nitrobenzol/KCl-Lösung. Wie würde nun diese angenommene Einlagerung von  $J_2$ -Molekülen in der Grenzfläche wirken? Das positive Potential kann eigentlich nur in einer Richtung gedeutet werden, nämlich als ein *Austausch* von Öldipolen gegen non-polare  $J_2$ -Moleküle. Dieser Austausch würde einen Austauschbeitrag  $E_{AT}$  zum Gesamtpotential bewirken (Siehe S. 65), was zur Verminderung des negativen Dipolbeitrages der Chlorbenzol-

Austausch  
von Dipolen  
gegen  $J_2$ -  
Moleküle.

oder Nitrobenzol-Moleküle  $E_{\mu}$  führen würde, d. h. die Jod enthaltende Wasserphase würde positiver werden. Die Anzahl der bevorzugt  $K^+$ -Ionen adsorbierenden Dipole, pro Volumelement

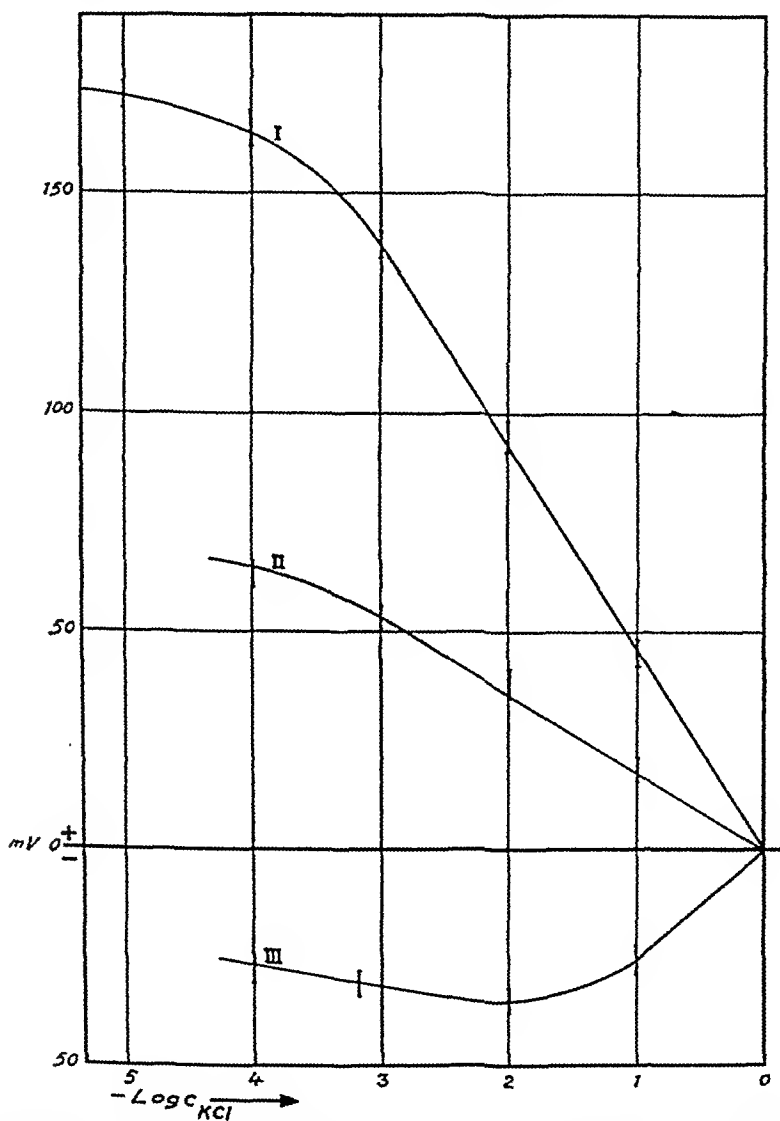


Fig. 14 b. System: 1-n  $KCl/C_6H_5Cl(+J_2)/x$ -n  $KCl$ . Einfluss von in der Ölphase gelöstem  $J_2$  auf die von  $KCl$ -Konzentrationsänderungen bewirkten Potentialänderungen im System. I: 0 %, II: 0.2 %, III: 1 %  $J_2$ .

Grenzfläche wird also herabgesetzt, was zu einer Verringerung der verschiedenartigen Solvation der  $K^+$ - und  $Cl^-$ -Ionen in der Grenzfläche (und überhaupt in der Ölphase) führt. Diese Überlegungen basieren auf der Annahme, dass die  $J_2$ -Mole-

küle in der Grenzfläche verankert werden können. Dabei darf jedoch nicht ausser acht gelassen werden, dass diese Verankerung bei Systemen, die nicht im Gleichgewicht sind, keineswegs eine absolute ist, sondern dass hier *ein steter Austausch* der  $J_2$ -

Moleküle stattfindet. Der Vergleich der Systeme I:  $H_2O/\overset{(A)}{Öl}/H_2O + J_2$  und II:  $H_2O/\overset{(A)}{Öl}/\overset{(B)}{Öl} + J_2/H_2O + J_2$ , wo das letztere bei B in scheinbarem Gleichgewicht ist, zeigt jedoch, dass das Potential von derselben Grössenordnung ist (Vgl. Fig. 12 und 13).

Die Grenzflächen B in beiden Systemen scheinen somit dieselbe Struktur zu besitzen, unabhängig davon, dass in II eine stetige Diffusion von  $J_2$ -Molekülen vorkommt. Zu diesem paradoxen Verhalten wurde schon beim System Nitrobenzol/Wasser in Gleichgewicht und Nicht-Gleichgewicht (Seite 72) ein Analogon gegeben. Das Durchdringen einer Grenzfläche scheint also in der Weise vor sich zu gehen, dass die betr. Moleküle (oder Ionen) durch *einen intermittenten Platzwechsel in der Kontaktzone* in die betr. Phase hineinwandern.

### Einfluss von Alkoholen.

Die vorangehenden Messungen der Potentialdifferenzen der Ölketten haben zu gewissen Anhaltspunkten für die Struktur der Grenzfläche zwischen zwei flüssigen Phasen geführt. Die ursprüngliche Absicht bei dieser Untersuchung war, unter diesen Grenzflächenphänomenen spezifische Erscheinungen aufzusuchen, die modellgemäss mit entsprechend physiologischen Erscheinungen verknüpft werden könnten.

Nach dieser langen Abschweifung über Zwischenflächenstruktur und Zwischenflächenpotentiale kehren wir wieder zurück zu dem Gedankengang, der in der Zusammenfassung von chemoselektiver Wirkung und Molekularstruktur (Seite 54) enthalten war. Dieser Gedanke war primär der, dass die Möglichkeit bestehe, bei der Einwirkung organischer Moleküle auf eine Grenzflächenstruktur spezifische Phänomene zu beobachten, die auf der Raumstruktur der einwirkenden Stoffe basieren. Durch Grenzpotentialmessungen würde man somit zu einem Aufschluss gelangen, wie insbesondere die Raumerfüllung der in einer Grenzfläche eingelagerten Fremdmoleküle auf die dort lokalisierten elektrischen Erscheinungen einwirken würde.

Anknüpfung  
an das Raum-  
struktur-  
problem.

Als Vorgeschichte zu den zu besprechenden Ölketten-Messungen sind einige Messungen an einem anorganischen Phasengrenzsystem, wo die Beteiligung der Raumerfüllung einiger organischer Verbindungen an Grenzpotentialerscheinungen beobachtet wurde, kurz zu erwähnen. Im System  $\text{Fe}/\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CrO}_3$  treten bei bestimmten Konzentrationen von  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und  $\text{CrO}_3$  periodische Potentialschwankungen auf, deren Frequenz vom Konzentrationsverhältnis  $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{CrO}_3$  abhängig sind. Für andere analoge Systeme siehe KARSCHULIN (1937), KARSCHULIN und EHRENSVÄRD (1938) und EHRENSVÄRD, KARSCHULIN und EHRENSVÄRD (1939). Der Grund dieser Frequenzabhängigkeit von der Konzentrationsbilanz  $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{CrO}_3$  ist in einem verschiedenartigen Diffusionswiderstand gegen die  $\text{H}_3\text{O}^+$  resp.  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{--}$ -Ionen zu suchen. Zufuhr von Neutralsalzen verschiebt die Frequenz in der Richtung einer verminderten  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{--}$ -Konzentration, was auf ein verhältnismässig stärkeres Abbremsen der grösseren  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{--}$ -Ionen im Verhältnis zu den kleineren  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionen zurückzuführen ist. Es zeigte sich hierbei, dass der Einfluss äquimolekularer Lösungen von Sulfaten verschiedener primärer Amine parallel mit der Anzahl von Kohlenstoffatomen anstieg (EHRENSVÄRD und EHRENSVÄRD 1937). Dieselbe Erscheinung trat bei Zufuhr äquimolekularer Lösungen der Sulfate von Mono-, Di-, Tri- und Tetra-äthylammonium auf. Der Einfluss auf die Frequenz nahm gleichmässig von dem primären bis zu dem quartenären Amin hinauf zu. Diese Wirkung der Amine hängt mit der verschieden grossen Raumbeanspruchung der Alkylgruppen zusammen, die einen kleineren oder grösseren Beitrag zum Diffusionswiderstand in unmittelbarer Nähe der Metalloberfläche bewirken könnte. In dem oben beschriebenen anorganischen Phasengrenzsystem ist also wahrscheinlich ein Raumstruktureffekt zugeführter organischer Verbindungen beobachtet worden.

Ein Raumstruktureffekt in einem anorganischen System.

Beim Messen des Einflusses organischer Verbindungen auf die Potentiale an flüssigen Phasengrenzflächen wurde zuerst versucht, Ketten vom Typus:

$\text{KCl-Lösung} / \text{Öl} / \text{Öl} + (\text{S}) / \text{KCl-Lösung}$  zu gebrauchen. Die Fremdschubstanz (S) wurde also der einen Ölphase zugesetzt. Ein schematisches Bild der Anordnung bietet Fig. 15.

Die beiden Hähne  $\text{H}_A$  und  $\text{H}_B$  mit weiter Bohrung ermöglichen die Absonderung der beiden Ölphasen voneinander. In die Phase B wurde die Fremdschubstanz — wenn sie flüssig war rein oder sonst in Öllösung — mittels einer Bürette zugesetzt. Die Menge Öl in den Schenkeln A und B betrug gewöhnlich 5 ccm. Die beiden Wasserphasen  $\text{W}_A$  und  $\text{W}_B$  wurden dem oben beschriebenen Elektrometerröhrengerät mittels zwei  $\text{KCl-Hg}_2\text{Cl}_2\text{-Hg}$ -Elektroden angeschlossen. Mit dieser Anordnung (im Folgenden kurz als Apparat 1 bezeichnet) wurde die Wirkung einiger aliphatischer und alizyklischer Alkohole gemessen. Über einige

Ein Vorversuch.

dieser Versuche haben EHRENSVÄRD und CHEESMAN (1941) vorläufig berichtet. Als Öl wurde bei diesem präliminären Experiment das gut leitende Salicylaldehyd benutzt. Es zeigte sich nun, dass bei der Zufuhr verschiedener Alkohole ein Asymmetriepotential im System auftrat, dessen Grösse je nach der Struktur

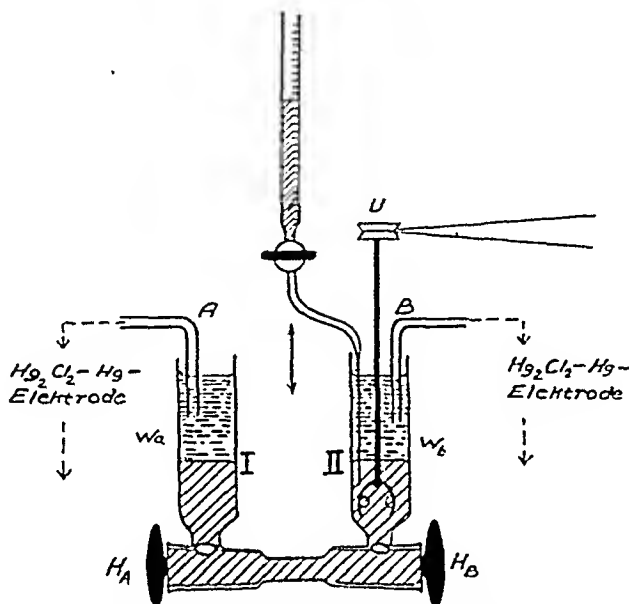


Fig. 15. Apparat zur Messung von Potentialdifferenzen im System: a-n KCl/Öl/Öl + x/a-n KCl; x = org. Verbindungen. A und B sind unpolarisierten Elektroden angeschlossen.  $W_a$  und  $W_b$  = die beiden Wasserphasen, I und II die betr. Zwischenflächen. U = Umrührer.  $H_A$  und  $H_B$  zwei Hähne mit weiter Bohrung.

der Alkohole variierte. Fig. 16 gibt dieses Asymmetriepotential beim Einwirken von n-Hexylalkohol und Cyklohexanol wieder. Die beiden KCl-Lösungen sind 0.0001-n.

Das Auftreten starker Asymmetriepotentiale bei der Zufuhr kleiner Mengen von Alkoholen gab Veranlassung, eine systematische Untersuchung über diese Erscheinung zu machen. Die Methodik war indessen nicht befriedigend, weil es aus Diffusionsgründen unmöglich war, beim Öffnen der Hähne  $H_A$  und  $H_B$  eine bestimmte Alkoholkonzentration im Schenkel B beizubehalten. Die Diffusion verlief dabei auch so schnell, dass oft nach kurzer Zeit Schlieren von Alkohol im Schenkel A zu beobachten waren. Versuche, den Diffusionsweg enger und länger zu machen, scheiterten an dem allzustarken elektrischen Widerstand dieser Anordnung. Es war also dringend nötig, eine Art gut leitender Zwischenschicht zwischen die beiden Ölphasen ein-

Verbesserung  
der Versuchs-  
anordnung.

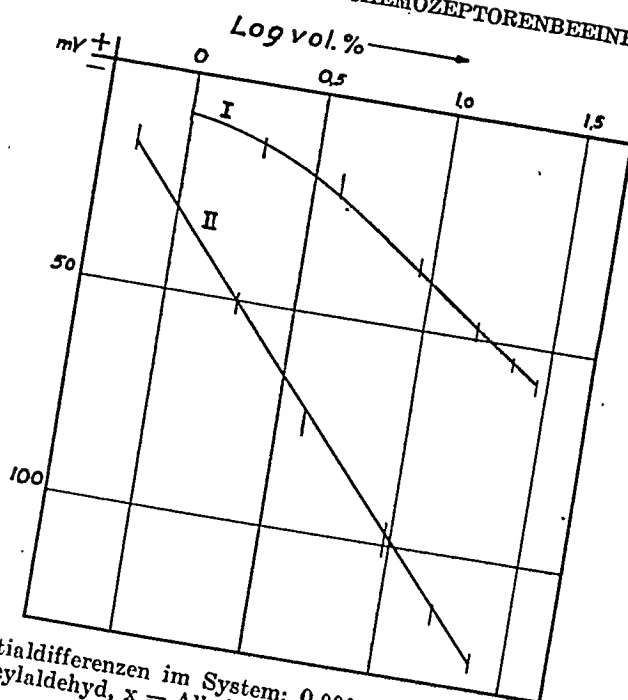


Fig. 16. Potentialdifferenzen im System:  $0.0001\text{-}n \text{ KCl}/A/A + x/0.0001\text{-}n \text{ KCl}$ .  
 $A$  = Salicylaldehyd,  $x$  = Alkohole; I:  $n$ -Hexanol, II: Zyklohexanol.

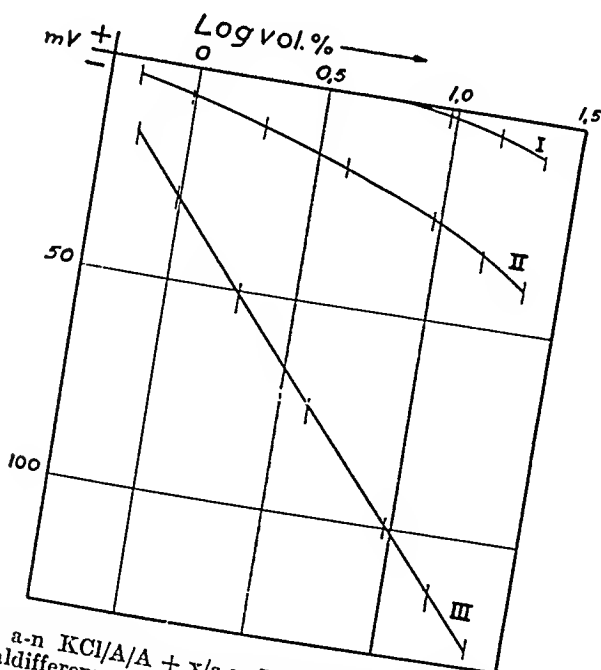
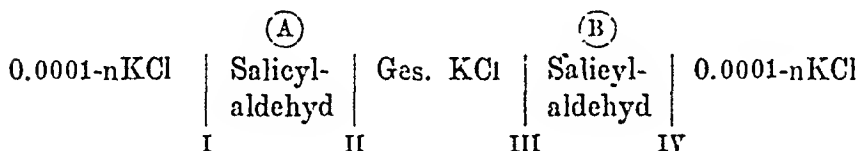


Fig. 17. System  $a\text{-}n \text{ KCl}/A/A + x/a\text{-}n \text{ KCl}$ .  $A$  = Salicylaldehyd,  $x$  = Zyklohexanol. Potentialdifferenzen im System bei der Einwirkung von Zyklohexanol bei variierender KCl-Konzentration. I: 1-n, II: 0.01-n, III: 0.0001-n.



zuschieben. Beobachtungen über den Einfluss der KCl-Konzentration auf den Alkohol-Effekt ergaben hier eine Lösung des Problems. Messungen des Asymmetriepotentials beim Zusetzen kleiner Mengen von Alkoholen bei verschiedenen KCl-Konzentrationen zeigten, dass der Alkoholeffekt bei gesteigerter KCl-Konzentration allmählich abnimmt, so dass er bei 1-n-Lösung nur noch einige mV beträgt, (Siehe Fig. 17).

Weitere Versuche zeigten, dass das Potential in der Grenzfläche gesättigter KCl-Lösung/Salicylaldehyd von der Einwirkung der verschiedensten Alkohole ziemlich unbeeinflusst blieb, und dass diese Erscheinung auch bei anderen Ölen auftrat. Eine gesättigte KCl-Lösung würde somit dem Ideal einer gut leitenden Zwischenschicht ziemlich nahe kommen. Es wurde nun folgende Kette (»Standardkette«) aufgebaut:



Der Ölphase B wurden die Alkohole zugeführt. Das auftretende Asymmetriepotential war hier beinahe ausschliesslich auf Änderungen in der Grenzfläche IV zurückzuführen, weil Grenzfläche III in Kontakt mit der gesättigten KCl-Lösung nur verschwindend kleine Beiträge zum Gesamtpotential der Kette bewirken könnte. Fig. 18 gibt ein schematisches Bild der Anordnung. (Siehe weiter Append. 1, S. 62.)

Das Mittelgefäss dieser Anordnung (Apparat 2) wurde mit ges. KCl-Lösung, die beiden Schenkel A und B mit 5.0 cc des betr. Öles gefüllt. Durch Drehen des Hahnes H wurde die KCl-Lösung mit den Ölphasen in Kontakt gebracht: das mit konz. KCl-Lösung angefeuchtete Hahnküken liess somit eine elektrische, aber keine hydrostatische Verbindung der beiden Ölphasen zu. Diesen wurde 5—7 cc einer 0.0001-n KCl-Lösung zugeführt. Diese Lösungen waren durch Heber, die mit derselben Lösung gefüllt waren, über Kapillarglasschliffe mit zwei 0.0001-n KCl/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hg-Elektroden verbunden. Die Stabilität der letzteren war für die Versuche genügend,  $\pm 2$  mV. Das Elektrometer-Kompensationsgerät war das vorher beschriebene (Siehe Append. 1, S. 62). Zur Zufuhr der Alkohole diente eine Bürette, deren Auslaufrohr zu einer sehr feinen Spitze ausgezogen war. Der Umrührer U gestattete ein gutes Mischen. Bei jedem Zusatz wurde die feine Spitze der Bürette durch die 0.0001-n KCl-Phase in die Ölphase B eingeführt, und unter Umrühren einer abgemessenen Menge Substanz zugeführt. Darauf wurde die Bürette wieder hochgezogen und

das Umrühren weitere 30 Sek. fortgesetzt. Die Messwerte sind der Durchschnittswert von 3—5 Bestimmungen. Die Einzelwerte konnten bis zu  $\pm 5\%$  von einander variieren, oft waren sie jedoch erstaunlich konstant. Die Angaben der Konzentration  $c$  beziehen sich auf die Volumenprocente zugesetzter Stoffe. Von evt. Mischungskontraktion wurde abgesehen. Fig. 19 zeigt die  $\delta E/\delta \log c$ -Kurven der  $n$ -primären Alkohole  $C_1$  bis  $C_{12}$ .

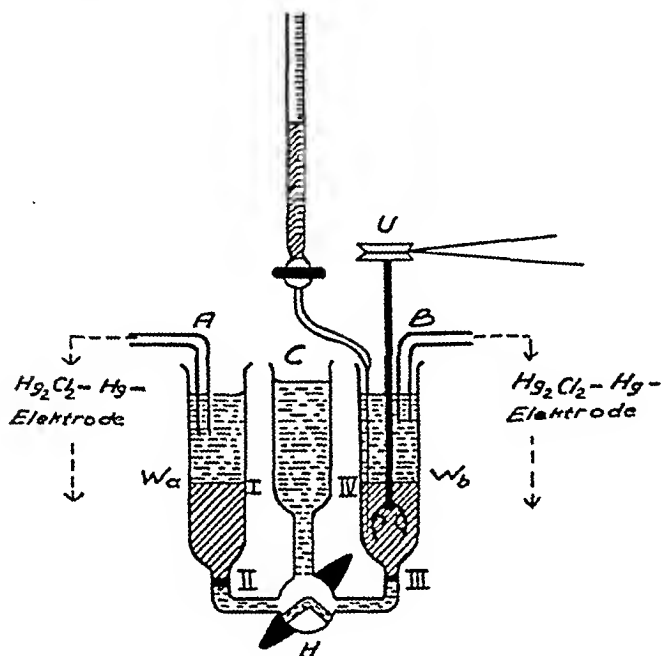


Fig. 18. Apparat zur Messung von Potentialdifferenzen im System: 0.0001-n KCl/Öl/Konz.KCl/Öl +  $x/0.0001$ -n KCl.  $W$  und  $W_b$  = die beiden 0.0001-n KCl-Phasen; in C befindet sich konz. KCl.  $U$  = Umrührer.  $H$  = Dreiweghahn mit L-Bohrung.

Wie man sieht, liegt die Mehrzahl der Alkohole innerhalb des schraffierten Gebietes. Ein abweichendes Verhalten zeigen  $C_7H_{15}OH$  und  $C_9H_{19}OH$ , die bei gleicher Konzentration ein weit grösseres Asymmetriepotential der Kette hervorrufen. Fig. 19 b zeigt das Asymmetriepotential bei einer Alkoholkonzentration von 4 % bei anwachsender Anzahl von Kohlenstoffatomen der aliphatischen Ketten. Der Einfluss der Kettenlänge ist erheblich und man dürfte hier von einer spezifischen Einwirkung der Alkohole  $C_7$  und  $C_9$  sprechen. Die Grösse des Potentials und seine Richtung machen die Annahme eines neu auftretenden Diffusionspotentials unwahrscheinlich. Die Wanderungsgeschwindigkeiten der  $K^+$ -Ionen sind in Alkoholen, sowie in dem, dem Salicylaldehyd nahestehenden Phenol immer kleiner als die der  $Cl^-$ -Ionen. Ein

Ein spezifisches Zwischenflächenphänomen.

Diffusion?  
Verteilung?  
Adsorption?

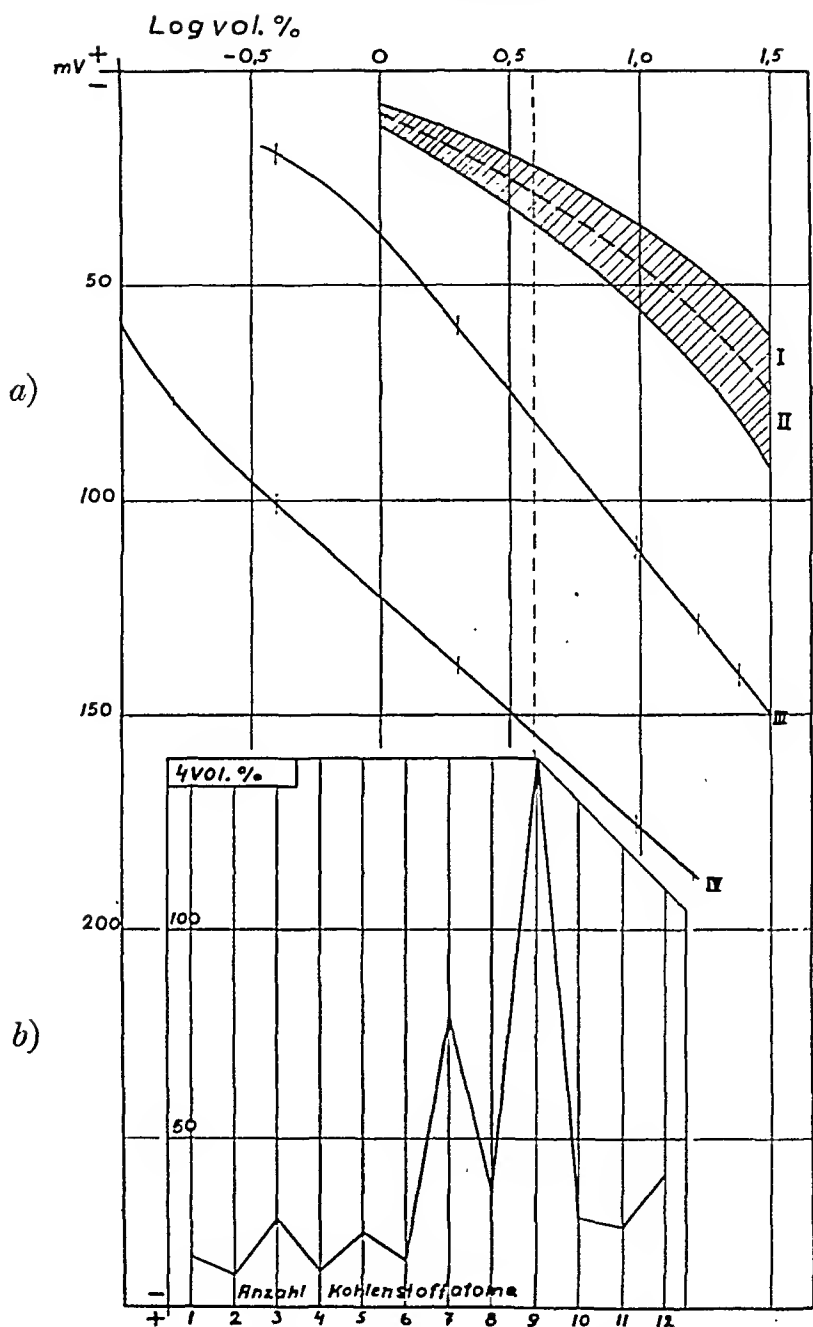


Fig. 19. Potentialdifferenzen im System: 0.0001-n KCl/A/Konz. KCl/A + x/0.0001-n KCl. A = Salicylaldehyd, x = aliphatische prim. n-Alkohole; I: Alkohole  $C_1, C_2, C_4, C_6$ , II:  $C_3, C_5, C_8, C_{10}, C_{11}, C_{12}$ , III:  $C_7$ , IV:  $C_9$ . a) Potentialdifferenz bei variierender Alkoholkonzentration. b) Potentialdifferenz bei 4 % Alkoholzusatz. Einfluss der Anzahl der Kohlenstoffatome. (Nach EHRENSVÄRD und CHEESMAN, 1941.)

neu hinzutretender *Verteilungsbeitrag* ist auch ziemlich unwahrscheinlich, weil er in derselben Richtung verlaufen müsste wie die Solvatation der Ionen von seiten des Salicylaldehyds. Hier ist übrigens die bevorzugte Solvatationsanlagerung der  $K^+$ -Ionen schon sehr gross. Es wäre also das nächstliegende, die Ursachen des Alkoholeffektes auf spezielle *Adsorptionsphänomene* in der Zwischenfläche IV zurückzuführen. Zunächst könnte man das auftretende Asymmetriepotential als die Differenz zweier

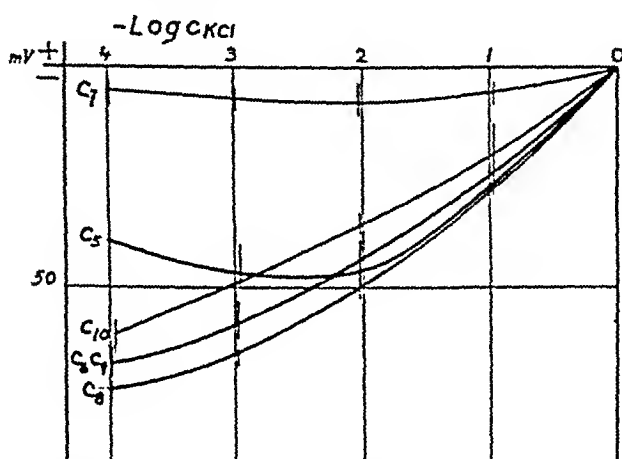


Fig. 20. Potentialdifferenzen im System: 1-n KCl/A/x-n KCl. A = prim. n-Alkohole:  $C_5$ ,  $C_6$ ,  $C_7$ ,  $C_8$ ,  $C_9$ , und  $C_{10}$ .

KCl-Effekte auffassen, nämlich die der Systeme: 0.0001-n KCl /Sal. ald./ Ges. KCl, und Ges. KCl/Sal. ald./ 0.0001-n KCl. Im  
 + Alkohol

Falle der »spezifisch« wirkenden  $C_7H_9OH$  und  $C_9H_9OH$  würden dabei zwei Möglichkeiten bestehen. Erstens könnte man sich denken, dass alle Alkohole in den Zwischenflächen III und IV (Seite 84) die Salicylaldehydmoleküle in gleichem Masse verdrängen und dass die Wirkung von  $C_7$  und  $C_9$  auf ganz speziellen KCl-Effekten basiert. Dem widerspricht indessen die Tatsache, dass die KCl-Effekte der Alkohole  $C_6$  bis  $C_{10}$  — mit Ausnahme von  $C_7$ ! — ziemlich analog verlaufen. Siehe Fig. 20. (Der spezielle KCl-Effekt von  $C_7$  würde übrigens einen *kleineren* Potentialbeitrag als die übrigen Alkohole liefern). Die zweite Möglichkeit, die bedeutend wahrscheinlicher ist, wäre die, dass die Alkohole  $C_7$  und  $C_9$  in der Zwischenfläche bevorzugt adsorbiert werden und dadurch speziell grosse Unterschiede der beiden KCl-Effekte der totalen Kette hervorrufen. Nun zeigt sich aber,

dass diese Unterschiede im Falle  $C_7$  und  $C_8$  *nicht ausreichend* sind, die »spezifischen» Potentiale der Kette zu erklären. Im Falle  $C_8$  (Fig. 21) beträgt die Differenz zwischen den KCl-Effekten des Salicylaldehyds mit 0 bzw. 1 %  $C_8$  etwa 40 mV, was in

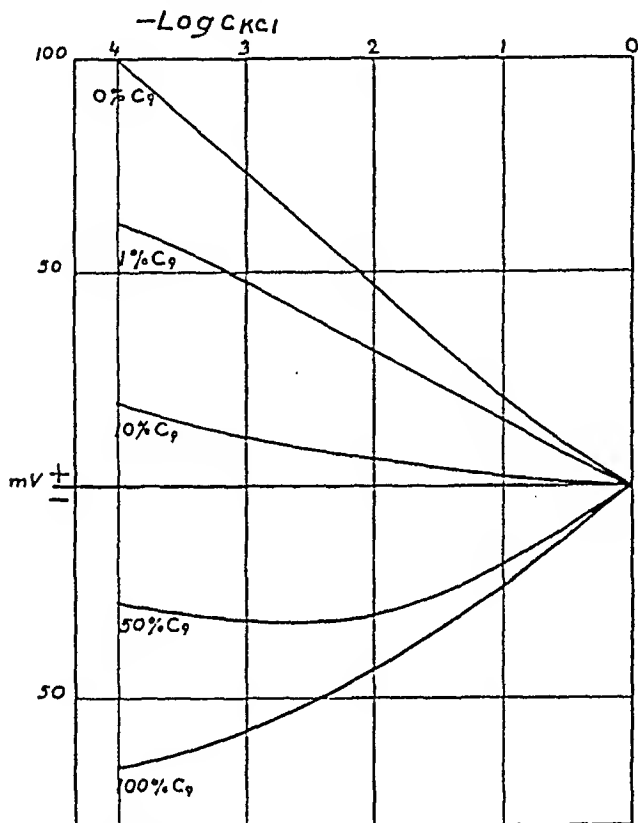


Fig. 21. Potentialdifferenzen im System: 1-n KCl/A +  $C_8$ /x-n KCl. A = Salicylaldehyd,  $C_8 = C_8H_8OH$ ; Konzentration: 0, 1, 10, 50 und 100 vol.-%.

scharfem Gegensatz zu dem Asymmetriewert von etwa 120 mV der Kette (Fig. 19) steht.

Dieses Verhalten gab Veranlassung, die Asymmetriepotentiale der Standardkette bei Einwirkung von  $C_8$  näher zu untersuchen. Erstens wurde das Potential der Kette: 0.0001-nKCl/Sal.ald./1-n-KCl/Sal.ald. + 1 %  $C_8$ /0.0001-nKCl gemessen, was die zu erwartenden Werte  $-47$ ,  $-42$ ,  $-46$ , Mittel  $-45$  mV ergab. Zweitens wurde zu dem symmetrischen System: 0.0001-n KCl/Sal.ald./1-n KCl/Sal. ald./0.0001-nKCl in schon beschriebener Weise  $C_8$  bis zu 1 % eintitriert, was in einem Asymmetriepotential von

—96, —91, Mittel —94 mV resultierte. Die entsprechenden Versuche mit 10 %  $C_6$  ergaben die Werte —85 bzw. —144 mV.

Bei der Titrierung wurde sorgfältig darauf acht gegeben, dass das Umrühren der Ölphase hinreichend effektiv war. Bei wiederholten Versuchen wurde sogar die Zwischenfläche IV selbst von dem Umrührer bearbeitet, ohne grössere Änderungen des Asymmetriepotentials hervorzurufen.

Um eine Erklärung für dieses Verhalten zu geben ist zunächst darauf hinzuweisen, dass die Zwischenflächen IV der beiden besprochenen Systeme trotz derselben  $C_6$ -Konzentration in der Ölphase höchstwahrscheinlich nicht als identisch anzusehen sind. Man merke sich den Unterschied: Im ersten Falle ist der Grenzfläche Salicylaldehyd +  $C_6$ /Luft eine 0.0001-n KCl-Lösung, im zweiten Falle der Zwischenfläche Salicylaldehyd/0.0001-n KCl  $C_6$  zugeführt worden. Aller Wahrscheinlichkeit nach wird der verschiedenartige »Aufbau« der Zwischenflächen IV verschiedene Bindungsverhältnisse in der Übergangszone zur Folge haben. Im ersten Falle ist bei Zufuhr der Wasserphase die Tendenz zu Wasserdipolbindung (H-Brücken!) durch die a priori bestehenden assoziativen Bindungen zwischen dem —CHO bzw. —OH des Salicylaldehyds und dem Alkohol —OH teilweise abgesättigt worden. Die Adsorption bzw. Verteilung der resp. Ionen wird hier hauptsächlich an bzw. in einer Grenzfläche (Salicylaldehyd + Alkohol)/ $H_2O$  geschehen. Im zweiten Falle bestehen a priori ausgesprochene Brückenbindungen zwischen der Chelatstruktur des Salicylaldehyds und den Wasserdipolen. Der Alkohol wird also hier in eine Struktur, die nicht allein als die Zwischenfläche Salicylaldehyd/ $H_2O$ , sondern als die Zwischenflächenstruktur (Salicylaldehyd +  $H_2O$ ) zu bezeichnen ist, eingelagert, was auf die spezielle Ionen-adsorption bzw. -verteilung in der Übergangszone rückwirken muss. (Der in gewissen Fällen ohne besondere Ursache eintretende Ausfall der »spezifischen«  $C_7$ - und  $C_6$ -Effekte könnte vielleicht auf eine Art Übergang zwischen den besprochenen Zwischenflächenstrukturen zurückgeführt werden).

Der »spezifische« Effekt von  $C_7$  und  $C_6$  muss also auf einem ganz speziellen Phänomen basieren, und zwar auf den räumlichen Verhältnissen der Kohlenwasserstoffketten. Es ist anzunehmen, dass diese Einlagerung von Alkoholmolekülen in die Grenzfläche sich in der Weise vollzieht, dass die OH-Gruppen nach der Wasserphase gerichtet sind. Die OH-Gruppen sind somit den Anziehungskräften von Wasserdipolen und Ionensolvaten

Das Mitspielen von Raumstruktur-faktoren.

ausgesetzt. Um mit der Wasserphase wirklich in Kontakt zu gelangen, müssen die Alkoholmoleküle zwischen den Salicylaldehydmolekülen eingelagert werden. Der zur Verfügung stehende Raum ist vom Abstand der Salicylaldehydmoleküle der Kontaktzone abhängig. Die Einlagerung der Alkoholmoleküle in diesen Raum muss mit einer *Verdrängung anwesender Wasserdipole verbunden sein*, und es ist anzunehmen, dass dieser Platzwechsel Alkoholdipole-Wasserdipole von der Raumbeanspruchung des ganzen Alkoholmoleküls beeinflusst wird. (EHRENSVÄRD und CHEESMAN 1941). Diese Verdrängung von Wasserdipolen aus der Kontaktzone muss darin resultieren, dass der neutralisierende Einfluss dieser Dipole auf die Einzelmomente der  $\text{—CHO}$ - und  $\text{—OH}$ -Gruppen des Salicylaldehydes teilweise aufgehoben wird, d. h., das Gesamtmoment der Zwischenflächenstruktur wird ansteigen. Es würde also der elektrostatische Beitrag ( $E\mu$ ) der  $\text{—OH}$ - und  $\text{—CHO}$ -Gruppen erhöht werden, was in einer Negativisierung der angrenzenden Wasserphase resultieren würde. Das Zeichen des gemessenen Kettenpotentials steht mit dieser Auffassung im Einklang.

Die räumliche Struktur der Zwischenflächenzone. Gegen den oben ausgeführten Gedankengang können natürlich die verschiedensten Einwände gemacht werden. Besitzen wir überhaupt irgend eine Kenntnis von der räumlichen Lage des Salicylaldehyds und der Alkoholmoleküle? Liegen die ersteren flach, vertikal oder in irgend einer Zwischenlage? Haben wir überhaupt einen Beweis für die angenommene entscheidende Bedeutung der Wasserdipole und deren »neutralisierende« Wirkung? Ist die Wirkung der Ionen direkt auszuschalten? Diese Einwände gegen die als *Hilfshypothese* aufgestellte Verdrängungstheorie sind durchaus berechtigt, weil die rein theoretischen Voraussetzungen bei dieser Betrachtungsweise ohne Zweifel sehr schwebend sind. Es besteht jedoch die Möglichkeit, das Problem im Rahmen des skizzierten Gedankenganges weiter anzugreifen, insbesondere in der Richtung einer Immobilisierung der Wasserdipole. Versuche in dieser Richtung sind von einem anderen Gesichtspunkt aus schon gemacht worden, (Vgl. Seite 84), nämlich das Messen des Einflusses erhöhter KCl-Konzentrationen auf den Alkoholeffekt. Das erwähnte Erlöschen des Alkoholeffektes bei konzentrierten KCl-Lösungen kann hier in neuartiger Beleuchtung gezeigt werden. Die bei gesteigerter KCl-Konzentration allmählich anwachsende Inanspruchnahme von Wasserdipolen zu Ionensolvatisierungszwecken wird die Anzahl

dipolgebundener Wasserdipole herabsetzen. In der Grenzfläche Salicylaldehyd (+ Alkohol)/ges. KCl-Lösung endlich sind keine für Dipolbindung zugänglichen Wasserdipole frei. Das gleichzeitige Erlöschen des Alkoholeffektes deutet hier einen Zusammenhang an. Weiter sind Versuche gemacht worden (EHRENSVÄRD und CHEESMAN 1941), ein von der Wasserphase aus bewirktes Inanspruchnehmen der freien und dipolgebundenen Wasserdipole ohne direkte Änderungen der KCl-Konzentration zu bewerkstelligen. Die eine KCl-Lösung wurde deshalb durch eine KCl-Gelatinelösung ersetzt und das Potential der Kette:

0.0001-n KCl	Salicylaldehyd	0.0001-n KCl + Gelatine	Salicylaldehyd (+ Alkohol)	0.0001-n KCl
--------------	----------------	----------------------------	-------------------------------	--------------

wurde gemessen.

Fig. 22 zeigt, wie das Kettenpotential bei verschiedenen Gelatinekonzentrationen durch Zusatz von Nonylalkohol beeinflusst wurde. Das Potential der Kette stieg beim Zusatz kleiner Mengen von Alkohol bis zu einem gewissen Grenzwert, um nachher bei weiterem Zusatz konstant zu bleiben. Die Steilheit des ersten Teiles der  $\delta E / \delta \log c$ -Kurven ist mit der Kette:

0.0001-n KCl	Salicylaldehyd	Ges. KCl	Salicylaldehyd (+C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> OH)	0.0001-n KCl
--------------	----------------	----------	--	--------------

direkt zu vergleichen. (Siehe Fig. 22, Kurve III).

Der Versuch deutet darauf hin, dass eine konzentrierte Gelatinelösung bei kleiner Alkoholkonzentration denselben Einfluss in der Ölphase ausübt wie eine ges. KCl-Lösung. Tatsächlich sind in der Wassergelatinephase grösstenteils die Wasserdipole am Aufbau der Gelstruktur engagiert. Dass der erste steile Abfall des Kettenpotentials bei weiterem Zusatz von Alkohol plötzlich abbricht ist auf eine durch den Alkohol bewirkte partielle Zerstörung der Gelstruktur zurückzuführen, was das allmähliche Freiwerden von Wasserdipolen zur Folge hat. Die Bedeutung der freien und dipolgebundenen Wasserdipole für den Alkoholeffekt ist somit durch die Beobachtungen über den Einfluss ges. KCl-Lösungen und Gelatine-Lösungen gewissermassen bestätigt worden. Es darf aber nicht übersehen werden, dass das totale Kettenpotential bei Alkoholfuhr ausser dem erwähnten Dipolbeitrag  $E_{\mu}$  noch aus zwei weiteren Effekten zusammengesetzt

Ein Versuch, die Wasserdipole zu binden.



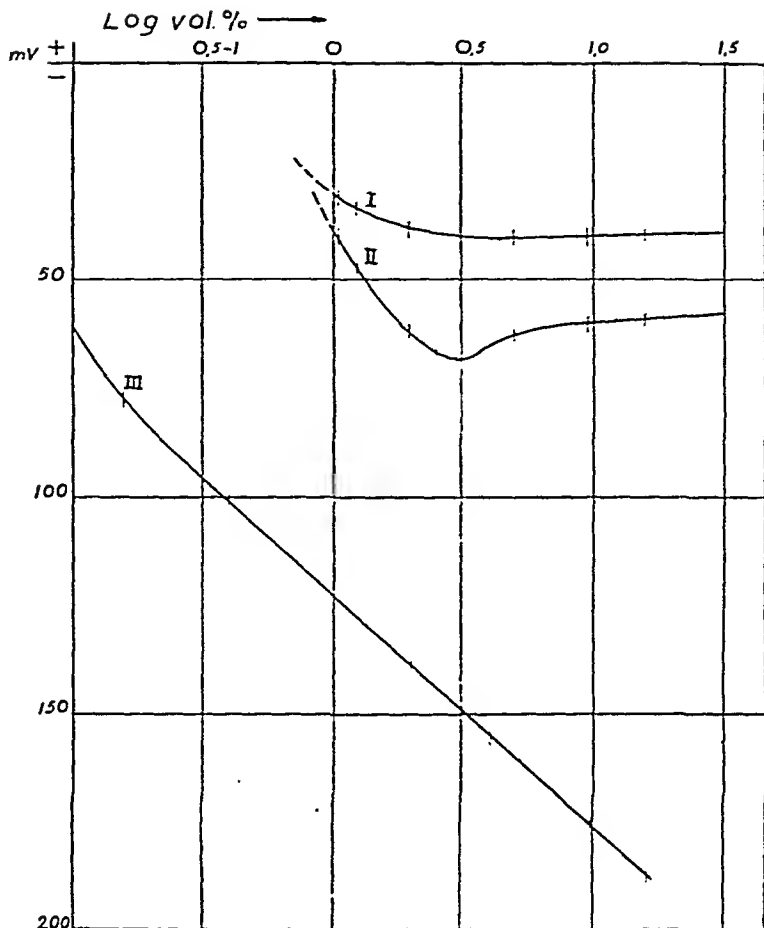


Fig. 22. Potentialdifferenzen im System:  $0.0001\text{-n KCl/A/G/A} + x/0.0001\text{-n KCl}$ . A = Salicylaldehyd,  $x = n\text{-C}_6\text{H}_{13}\text{OH}$ , G = erstarrte Gelatine-Lösung; I: 5 %, II: 20 %. Kurve III zeigt den Potentialverlauf beim Ersatz der Gelatine-Lösung durch konz. KCl.

sein muss. Erstens werden die eingelagerten Alkoholdipole selbst (neg. Ende gegen die Wasserphase!) einen eigenen Beitrag,  $E_A$ , zum Dipolanteil liefern und die Anzahl der für  $\text{K}^+$ -Adsorption verfügbaren Plätze erhöhen und zweitens wird die erhöhte Konzentration bevorzugt Kationen solvatisierender Dipole einen besonderen Verteilungsbeitrag  $E_V$  bewirken. Beide Effekte wirken in derselben Richtung wie der Beitrag der Wasserstoffdipolverdrängung.

Von grossem Interesse ist, dass die *Zwischenflächenspannungen bei Einwirkung der Alkohole  $\text{C}_6\text{—C}_{10}$  keine Anormalitäten aufweisen*, Fig. 23.

Einfluss der Alkohole auf die Zwischenflächenspannung.

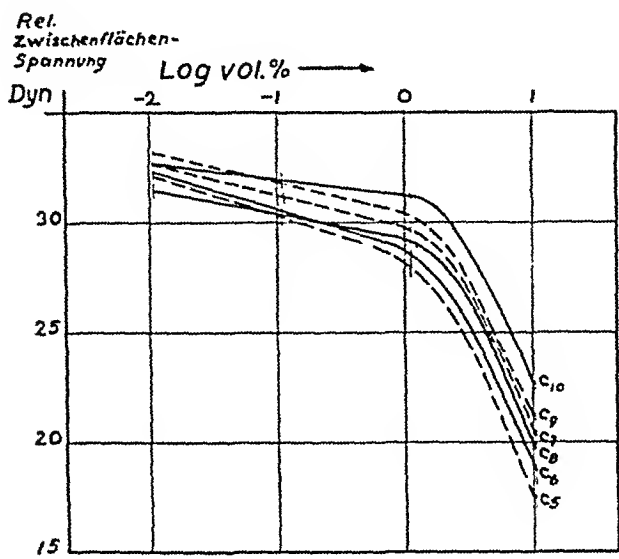


Fig. 23. Einwirkung aliphatischer prim.n-Alkohole (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>) auf die Zwischenflächenspannung: Salicylaldehyd/0.0001-n KCl. Bestimmung nach BARTELL und MILLER (1933). Zwischenflächenspannung in rel. Einheiten.

Zur übersichtlicheren Darstellung des Alkoholeffekts ist jetzt die folgende Tabelle zusammengestellt.

Tabelle III.  
Alkoholeffekt in der Kette:  
I II III IV  
0.0001-n KCl/Salicylaldehyd/Ges/Salicylaldehyd/0.0001-n KCl  
A B KCl + Alkohol D  
C

Eine Zusammenstellung.

Urspr. Beiträge zum Gesamtpotential-sprung in den Grenzflächen I und IV	Durch Alkohol-zusatz bewirkte Potentialbeiträge in IV	Zeichen der Potential-änderung der KCl-Lösung D im Verhältn. zu A	Ursachen
<i>Dipolbeitrag E<sub>u</sub> der Grenzflächendipole, durch den Richtungs-sinn der Kombination Salicylaldehyd-Wasserdipole verursacht.</i>	<i>Dipolbeitrag E'<sub>u</sub> &gt; E<sub>u</sub></i>	—	Erhöhte Dichte negativer Dipole in der Grenzfläche.
	<i>Dipolbeitrag E''<sub>u</sub></i>	—	Verdrängung von auf das Gesamtmoment partiell neutralisierend wirkenden Wasserdipolen.
	<i>Dipolbeitrag E'''<sub>u</sub></i>	(+) (-)	Partielle gegenseitige Assoziation von Salicylaldehyd und Alkoholdipolen.

Urspr. Beiträge zum Gesamtpotential-sprung in den Grenzflächen I und IV	Durch Alkohol-zusatz bewirkte Potentialbeiträge in IV	Zeichen der Potential-änderung der KCl-Lösung D im Verhältn. zu A	Ursachen
<i>Adsorptionsbeitrag</i> $E_A$ , durch bevorzugte Adsorption von $K^+$ -Ionen verursacht.	<i>Adsorptionsbeitrag</i> $E'_A > E_A$	—	Erhöhte Anzahl von zur $K^+$ -Adsorption zur Verfügung stehenden Plätzen
<i>Verteilungsbeitrag</i> $E_V$ , durch bevorzugte Solvation von $K^+$ -Ionen verursacht.	<i>Verteilungsbeitrag</i> $E'_V$	—	Veränderte Dichte von Öldipolen mit bevorzugt $K^+$ -solvatisierender Tendenz in der Grenzfläche.

Die Stärke und das Vorzeichen des Dipolbeitrages  $E'''\mu$  sind problematisch und hängen ganz von der gegenseitigen räumlichen Lage der Salicylaldehyd- und Alkohol-Moleküle in der Grenzflächenstruktur ab. Wahrscheinlich ist dieser Beitrag ziemlich schwach. Die Untersuchungen, insbesondere von SCHULMAN und RIDEAL (1937), über die Potentialänderungen monomolekularer Filme bei Einlagerung von Fremdmolekülen (z. B. des Systems Saponin-Cetylalkohol) geben einen gewissen Aufschluss über diese Verhältnisse. Die totale Wirkung der Alkohole geht also in der Richtung eines Negativwerdens der KCl-Lösung D, was mit den bisherigen Experimenten übereinstimmt. Weitere Versuche über die Einwirkung von Alkoholen und anderen Substanzen auf die Grenzpotentiale werden obige Auffassung dieses *Einlagerungseffektes* bestätigen. Insbesondere ist es nötig, die spezifische Wirkung der Alkohole  $C_7$  und  $C_8$  näher zu untersuchen. Bis jetzt ist von dieser Wirkung nur gesagt worden, dass sie mit »der räumlichen Konfiguration der Kohlenwasserstoffkette zusammenhängt«. Dies ist aber keine Erklärung. Um nun dem Unterschied zwischen den »Einlagerungseffekten« der Alkohole  $C_7$  und  $C_8$  einerseits,  $C_1-C_6$ ,  $C_8$  und  $C_{10}-C_{12}$  andererseits wenigstens eine qualitative Deutung zu geben, wurde das Problem nach 2 verschiedenen Richtungen hin angegriffen. Erstens wurde gemessen, wie Konfigurationsänderungen der Alkohole und danach andere Stoffe auf den Einlagerungseffekt wirkten, zweitens, welchen Einfluss ein Austausch der Ölphase (in diesem Falle des Salicylaldehyds) gegen anderen nahestehenden Verbindungen hatte. Das gemessene System war die gewöhnliche Standardkette:

I II III IV  
0.0001-n KCl/Salicylaldehyd/ges. KCl/Salicylaldehyd/0.0001-n KCl  
+ Alkohol

A  
Es wurde nun untersucht, wie die Stellung der OH-Gruppe  
in der Kohlenwasserstoffkette den Einlagerungseffekt der Alka-

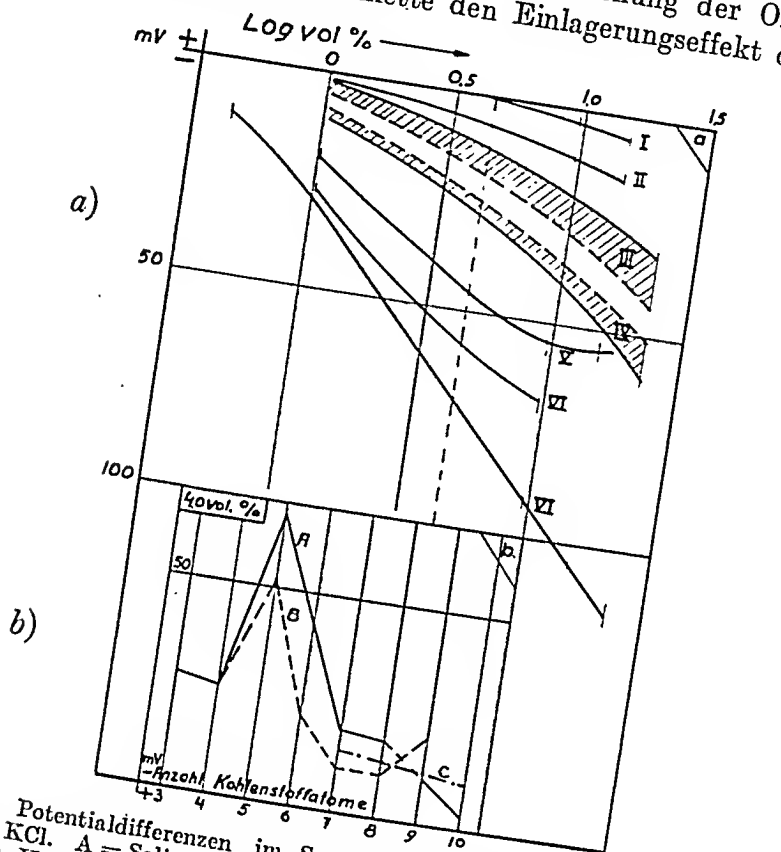


Fig. 24. Potentialdifferenzen im System: 0.0001-n KCl/A/Konz.KCl/A + x/0.0001-n KCl. A = Salicylaldehyd, x = aliphatische sek.n-Alkohole; I: C<sub>10</sub>-2, II: C<sub>10</sub>-4, III: C<sub>7</sub>-3, C<sub>7</sub>-4, C<sub>8</sub>-4, C<sub>9</sub>-4, IV: C<sub>5</sub>-2, C<sub>6</sub>-2, C<sub>6</sub>-3, C<sub>7</sub>-2, C<sub>8</sub>-2, C<sub>9</sub>-2, V: C<sub>6</sub>-2, VI: C<sub>5</sub>-3, VII: C<sub>5</sub>-2. (Teilweise nach EHRENSVÄRD und CHEESMAN 1941).

nole beeinflussen würde. Fig. 24 zeigt die Kurven der Potentialänderungen bei Zufuhr von Alkanolen -2, -3 und -4 zu der Standardkette.

Die Wirkung der Pentanole -2 und -3, sowie die der Hexanole -2 und -3 ist ersichtlich bedeutend stärker als die der anderen sekundären Alkanole. Fig. 24 b zeigt das Kettenpotential der Alkanole -2, -3 und -4 bei einer Konzentration von 4 % in der Ölphase B im Verhältnis zu der totalen Anzahl der Kohlenstoffatome (EHRENSVÄRD und CHEESMAN

1941). Der Gedanke liegt nahe, das Maximum des Effektes bei  $C_5-C_6$  mit der Bildung von losen, ringähnlichen Strukturen zusammenzustellen, insbesondere, weil Cyklohexanol viel grössere Effekte als die entsprechenden offenen Alkanole (Siehe Fig. 25) aufweist.

Es unterliegt keinem Zweifel, dass die alizyklischen Strukturen im Verhältnis zu den »offenen« Strukturen eine grössere Raum-

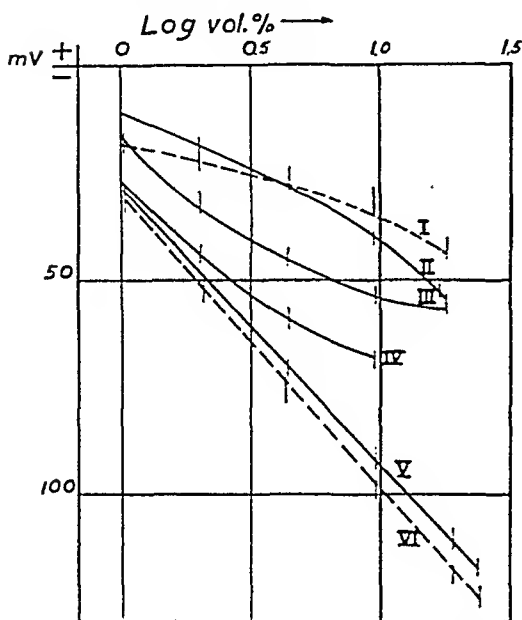


Fig. 25. Potentialdifferenzen im System: 0.0001-n KCl/A/Konz.KCl/A + x/0.0001-n KCl: A = Salicylaldehyd, x = einige sek. Alkohole mit »offenen« oder Ringstruktur, I: Zyklopentanol, II: Hexanol-3, III: Hexanol-2, IV: Pentanol-3, V: Pentanol-2, VI: Zyklohexanol.

beanspruchung ausüben. Bei den alizyklischen Alkoholen ist also eine erhöhte Verdrängung der Wasserdipole ( $E''\mu$ -Beitrag) aus der Grenzflächenstruktur zu erwarten, was sich in einer erhöhten Negativisierung der KCl-Lösung D äussern wird. Die Frage ist aber, ob nicht der angenommene »Einlagerungsraum« in der Grenzfläche einen begrenzenden Faktor einschliesst, der die Einlagerung von alizyklischen Strukturen mit noch grösserer Raumbeanspruchung schliesslich erschweren wird. Bei Untersuchung der Wirkung der drei Methylzyklohexanole, sowie des Menthols zeigte sich deutlich, dass der Effekt bei gewissen Strukturen beträchtlich abfiel (Fig. 26 c). Überhaupt kann der Einfluss von Methylgruppen auch in offenen Strukturen erheblich sein. Die Grösse und Richtung dieses Einflusses scheint von dem Bau der Strukturen und der Stellung der Methyle abhängig zu sein. Fig. 26 a und b zeigen einige Beispiele.

Es scheint also, als ob es in der Grenzfläche gewisse begrenzte Räume gibt, die für die Einlagerung der Alkohole zur Verfügung stehen. Hier gelangen wir zu einer Anknüpfung an das Spezifitätsproblem, weil die spezifische Wirkung eines gewissen Alkohols, d. h. ein maximaler Effekt im Verhältnis zu

Die Frage des »Einlagerungsraumes«.

anderen Alkoholen, eintreten würde, wenn die betr. Struktur sich der des Einlagerungsraumes möglichst gut anschliesst. Die Verdrängung der Wasserdipole aus dem Einlagerungsraum würde hier maximal sein. Ist diese Annahme überhaupt berechtigt, so könnte man aus der räumlichen Struktur des, einen maximalen Effekt bewirkenden Alkohols gewisse Schlüsse auf die »Raumstruktur« der Einlagerungsräume in der Grenzfläche ziehen. Dies gilt natürlich nur für Stoffe mit einer gewissen Stabilität der Struktur (z. B. die Zylohexanole). Die räumliche Struktur der n-Heptyl- und n-Nonyl-

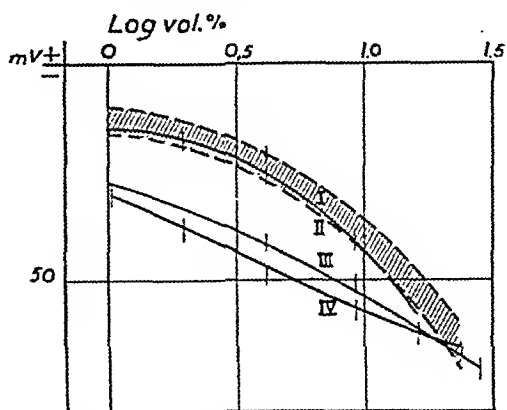


Fig. 26 a. Potentialdifferenzen im System: 0.0001-n KCl/A/Konz.KCl/A + x/0.0001-n KCl. A = Salicylaldehyd, x = I: (schraffiertes Gebiet) n-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>OH, n-C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>OH, II: i-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, III: i-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>OH, IV: i-C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>OH. Vergleich zwischen der Einwirkung von n- und iso-Alkoholen (Nach EHRENSVÄRD und CHEESMAN, 1941).

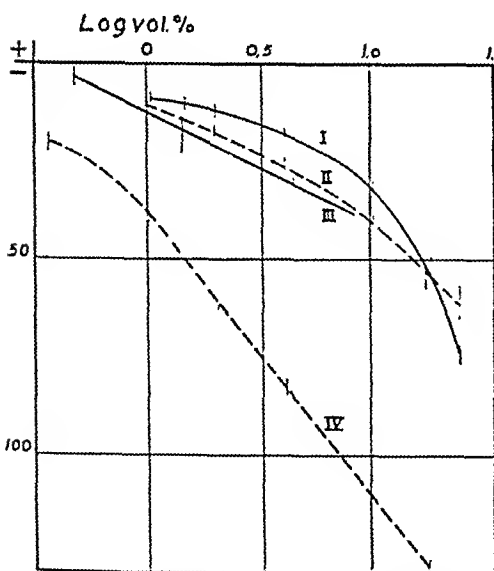


Fig. 26 b. Potentialdifferenzen im System: 0.0001-n KCl/A/Konz.KCl/A + x/- 0.0001-n KCl. A = Salicyldehyd, x = I: 3-Methylheptanol, II: n-Pentanol, III: 3-Methylheptanol, IV: n-Heptanol. Einfluss von Methylgruppen in geraden Ketten. (Nach EHRENSVÄRD und CHEESMAN 1941).

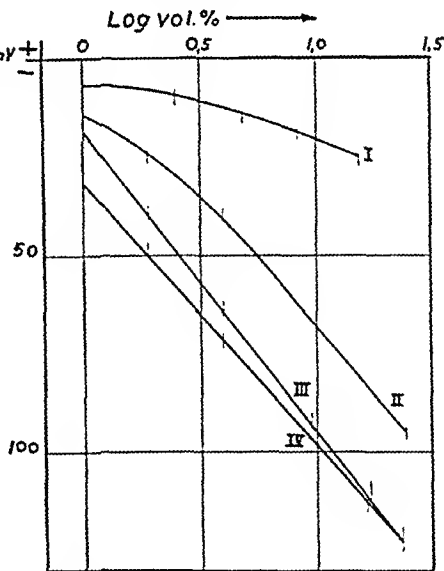


Fig. 26 c. Potentialdifferenzen im System: 0.0001-n KCl/A/Konz.KCl/A + x/- 0.0001-n KCl. A = Salicylaldehyd, x = I: Menthol, II: p-Methylzyklohexanol, III: m-Methylzyklohexanol, IV: Zyklohexanol und o-Methylzyklohexanol, Einfluss von Methylgruppen in alicyclischen Strukturen. (Nach EHRENSVÄRD und CHEESMAN 1941).

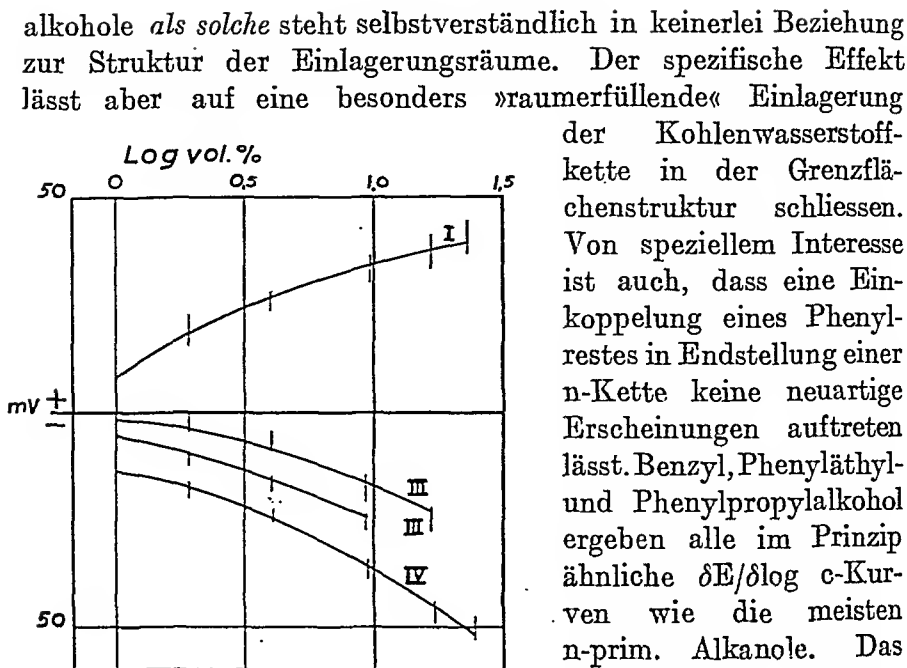


Fig. 27. Potentialdifferenzen im System: 0.0001-n KCl/A/Konz.KCl/A + x/0.0001-n KCl. A = Salicylaldehyd, x = I:  $C_6H_5OH$ , II:  $C_6H_5CH_2OH$ , III:  $C_6H_5CH_2CH_2OH$ , IV:  $C_6H_5CH_2CH_2CH_2OH$ .

dipole zurückzuführen, was ein verkleinertes Totalmoment der Zwischenflächen bewirken würde. Siehe fig. 27.

Die bisherigen Ausführungen haben uns allmählich zu dem physiologischen Begriff »Einpassung« geführt, der durch EMIL FISCHER in seinem berühmten Vergleich von dem Schlüssel im Loch formuliert worden ist (FISCHER 1894). Die Frage ist nun, ob in der Grenzfläche Salicylaldehyd/0.0001-n KCl nicht auch noch andere Verbindungen als Alkohole ähnliche Wirkungen ausüben können.

#### Der Einfluss von einigen Kohlenwasserstoffen.

Zuerst werden einige Versuche mit reinen Kohlenwasserstoffen gezeigt, Fig. 28. Es ist interessant, dass die aliphatischen n-Hexan und n-Heptan keinen Einfluss auf das Grenzpotential, Zyklohexan hingegen einen ziemlich grossen ausübt. Im Verhältnis zu den entsprechenden Alkoholen fehlt hier für die Grenzflächenverankerung die treibende Kraft einer wasserdipolanziehenden

OH-Gruppe. Eine gewisse Einlagerung ist jedoch sicher vorhanden, doch sind die äusserst leicht zu deformierenden offenen Kohlenwasserstoffstrukturen wahrscheinlich zu keiner Wasserdipolverdrängung befähigt. Das Moment der Grenzfläche bleibt also unverändert, ebenso die Anzahl  $K^+$ -adsorbierender und -solvatisierender Dipole. Zylohexan dagegen hat mit seiner stabileren Struktur bedeutend grössere Möglichkeiten, einen  $E''\mu$ -Beitrag im Sinne einer Zylohexanolwirkung zu liefern. Der bedeutend herabgesetzte Effekt des Methylzylohexans deutet auf einen räumlichen Einfluss der Methylgruppe, die die adsorptive Einlagerung in einer speziellen Richtung erschweren würde. Dagegen ist eine Einlagerung von  $CCl_4$  und  $CHCl_3$  möglich, was aus den ziemlich starken

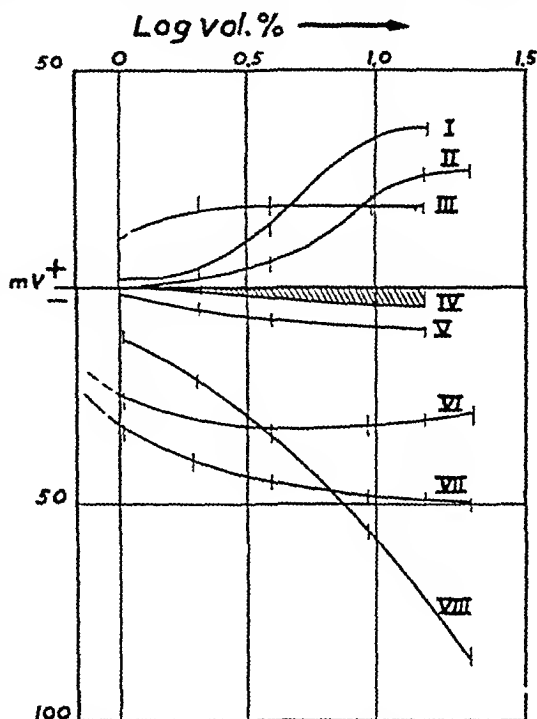


Fig. 28. Potentialdifferenzen im System:  $0.0001\text{-}n\text{ KCl}/A/\text{Konz. KCl}/A + x/0.0001\text{-}n\text{ KCl}$ . A = Salicylaldehyd,  $x = \text{I: } C_6H_5Cl$ , II: Dekahydronaphthalin, III:  $C_6H_6$ , IV: n-Hexan, n-Heptan, V: Methylzylohexan, VI:  $CHCl_3$ , VII:  $CCl_4$ , VIII: Zylohexan. Einwirkung von einfachen und chlorierten Kohlenwasserstoffen.

Potentialänderungen von seiten dieser Stoffe zu ersehen ist.

Der Einfluss von Ketonen und Aldehyden. Der Effekt der offenen und zyklischen Ketone stimmt in seiner Grösse mit dem der analogen Alkohole überein. Das zeigt, dass die Raumstrukturen dieser Verbindungen ziemlich die gleichen sind. Dass das Verankerungsvermögen der  $-CO$ -Gruppe dem der  $-CHOH$ -Gruppe grössenordnungsgemäss gleichartig sein würde, war ja von vornherein zu vermuten. Siehe Fig. 29 a.

Bei Untersuchung des Einflusses n-aliphatischer Aldehyde treten interessante Diskrepanzen im Verhältnis zu der Wirkung der entsprechenden n-prim-Alkohole auf. (Siehe Fig. 29 b). Es ist hier besonders auffallend, dass die Aldehyde  $C_7$  und  $C_8$  keinerlei

Ketone und Aldehyde.



spezifische Effekte bewirken, in scharfem Gegensatz zu den entsprechenden Alkoholen. (Die leichte Oxydierbarkeit der Aldehyde

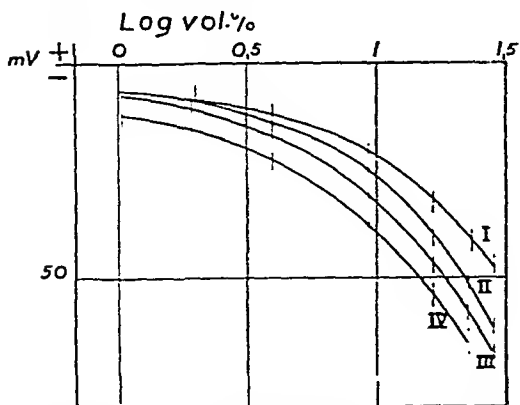


Fig. 29 a. Potentialdifferenzen im System:  $0.0001\text{-n KCl/A/Konz.KCl/A} + x/0.0001\text{-n KCl}$ . A = Salicylaldehyd,  $x = \text{I: Methyl-n-hexylketon, o-Methylzyklohexanon, II: Zyklohexanon, o-Methylzyklohexanon, III: m-Methylzyklohexanon, IV: CH}_3\text{COC}_2\text{H}_5$ . Einwirkung von Ketonen.

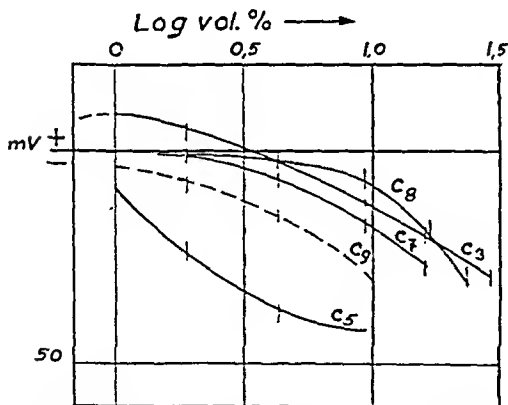


Fig. 29 b. Potentialdifferenzen im System:  $0.0001\text{-n KCl/A/Konz.KCl/A} + x/0.0001\text{-n KCl}$ . A = Salicylaldehyd,  $x = \text{aliphatische prim.-n-Aldehyde}$ .

machte es übrigens sehr schwer, übereinstimmende Messwerte zu bekommen.)

#### Der Einfluss von Aminen.

Beim Zusatz von Aminen können erhebliche Potentialänderungen beobachtet werden, und zwar in sehr kleinen Konzentrationen. Das Zeichen des Asymmetriepotentials der Kette gibt Anlass zum Nachdenken. Man dürfte von Anfang an erwarten, dass die Einlagerung positiver Dipole eine Positivierung der KCl-Lösung D der Standard-Salicylaldehyd-Kette bewirken würde. Das Ergebnis der Versuche zeigt jedoch, dass hier im Verhältnis zu den nichtionisierten Kohlenwasserstoffen, Alkoholen, Aldehyden und Ketonen ein ganz anderer Mechanismus tätig ist. Zuerst ist natürlich eine reine Ionenwirkung anzunehmen, d. h. die Basizität der Verbindungen müsste für den Effekt

verantwortlich sein. Folgende Versuchsreihe ergibt aber das etwas verblüffende Resultat, dass die Amine Anilin, Piperidin und Pyridin Effekte von gleicher Grössenordnung bewirken, (Fig. 30 a).

Die rein chemische Wirkung dieser Stoffe ist gänzlich verschieden. Anilin verbindet sich direkt mit Salicylaldehyd zu einer SCHIFF'schen Base, das stark basische Piperidin bildet Phe-

nolat (Rotfärbung) und das tertiäre Pyridin endlich tritt sicher in keinerlei Reaktionsverlauf ein. Das paradoxe Verhalten der Amine zeigte die Notwendigkeit, andere Kettensysteme zu untersuchen, um klarzustellen, ob die gemessenen Amineffekte etwas

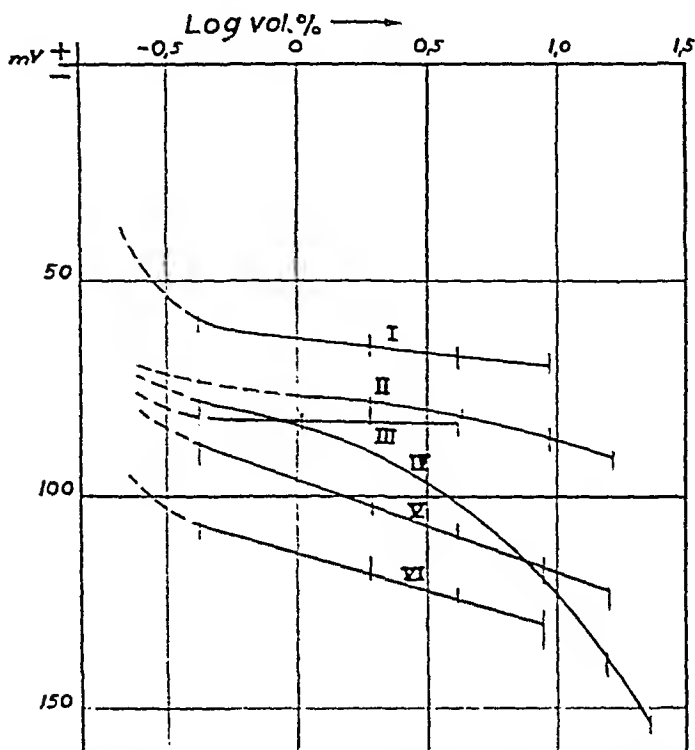


Fig. 30 a. Potentialdifferenzen im System: 0.0001-n KCl/A/Konz.KCl/A + x/0.0001-n KCl. A = Salicylaldehyd, x = I: Anilin, II: Piperidin, III: N-Äthylanilin, IV: Chinolin, V: Pyridin, VI: N-i-Amylanilin. Einwirkung einiger Amine.

für Salicylaldehyd Charakteristisches darstellen, oder ob sie auch bei gewissen anderen Dipolölen auftreten.

Einfluss der Konstitution der organischen Phase auf die von organischen Stoffen bewirkten Grenzflächenpotentialänderungen. Zuerst wird über den Amineffekt beim Auswechseln des Salicylaldehyds aus der Standardkette gegen Nitrobenzol berichtet (Siehe Fig. 30 b und 30 c).

Die Kurven zeigen, dass die stark »negative« Wirkung der Amine beibehalten ist. Die Bedeutung der OH-Gruppe des Salicylaldehyds ist somit gänzlich sekundär, woraus man schliessen kann, dass eine evt. Phenolatbildung keinen wesentlichen Beitrag zum Potential liefern wird. Der Austausch von  $-\text{CHO}$

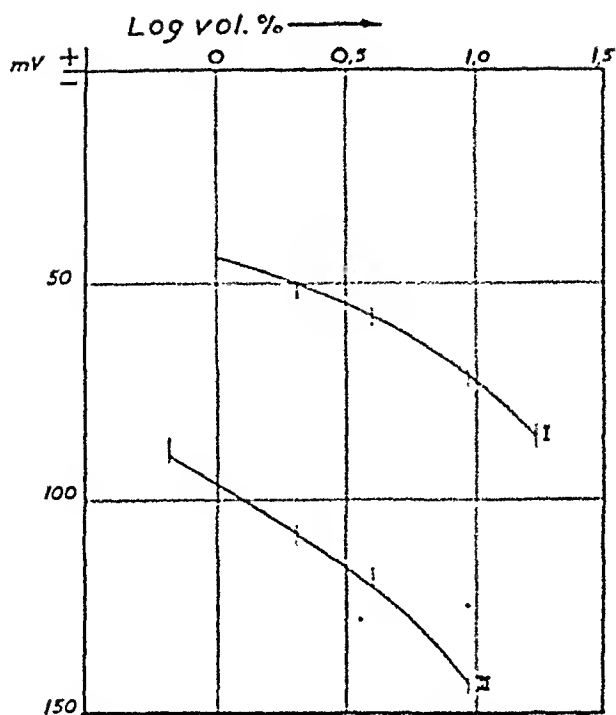


Fig. 30 b. Potentialdifferenzen im System: 0.0001-n KCl/A/Konz.KCl/A+x/-0.0001-n KCl. A =  $C_6H_5NO_2$ , x = I: Anilin, II: Pyridin.

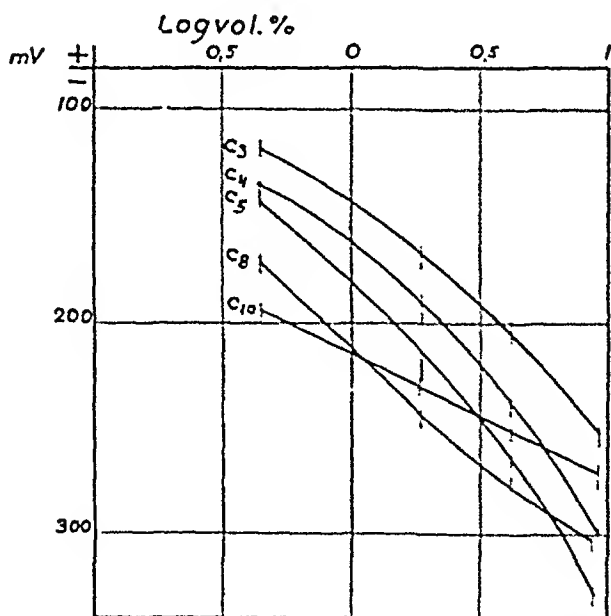


Fig. 30 c. Potentialdifferenzen im System: 0.0001-n KCl/A/Konz.KCl/A+x/-0.0001-n KCl. A =  $C_6H_5NO_2$ , x = einige aliphatische prim.n-Amine.

ÜBER DIE PRIMÄRVORGÄNGE BEI CHEMOZEPTORENBEEINFLUSSUNG. 103

gegen  $-\text{NO}_2$  schaltet die Bedeutung der Bildung von  $-\text{CH} = \text{N}$ -Strukturen von seiten der prim.-Amine aus. Es bleibt somit von rein chemischen Vorgängen nur eine Molekülverbindungs-

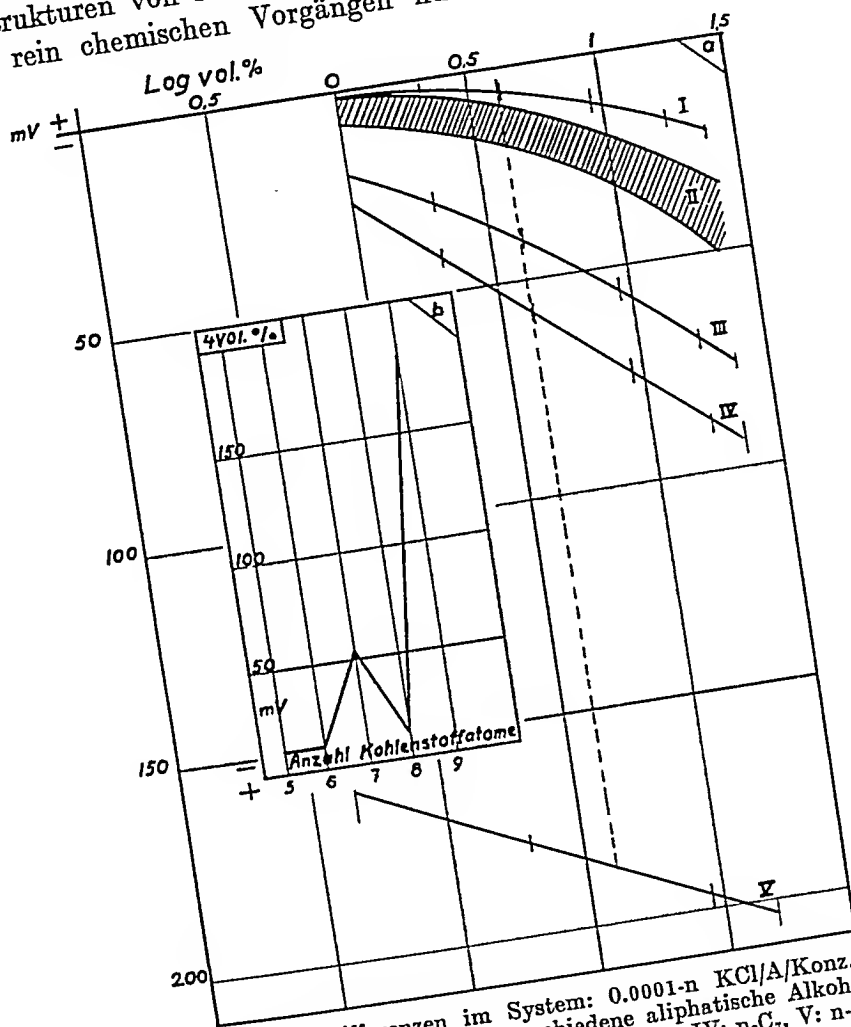


Fig. 31 a. Potentialdifferenzen im System: 0.0001-n KCl/A/Konz.KCl/A+x/-0.0001-n KCl. A =  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CHO}$ , x = verschiedene aliphatische Alkohole: I:  $\text{C}_2$ , II:  $\text{n-C}_3$ ,  $\text{n-C}_4$ ,  $\text{n-C}_5$ ,  $\text{C}_5$ -2,  $\text{C}_6$ -2, i- $\text{C}_4$ , III: i- $\text{C}_5$ , IV:  $\text{n-C}_7$ , V:  $\text{n-C}_9$ .

bildung übrig. Beim Nitrobenzol-Anilin ist diese sichergestellt (PFEIFFER 1928 a), was auch aus der Gelb- bis Rot-Färbung des Gemisches zu ersehen ist.

Dass bei Nitrobenzol eine, den Aldehyden analoge Wirkung hervorgerufen wird ist aus dem analogen elektronstrukturellen Verhalten der  $-\text{E}$  bewirkenden  $-\text{NO}_2$ - und  $-\text{CHO}$ -Gruppen zu ersehen. Das Dipolmoment der Gruppen ist ausserdem ziemlich gleich,  $\mu = 3.95$  und  $\mu = 2.95$ . Beim Einwirken verschiedener Alkohole

Die allgem. Einlagerungsmöglichkeiten.

auf Nitrobenzol- und Benzaldehydketten findet man prinzipiell dieselben Phänomene wie bei Salicylaldehyd wieder. Bei keinem der Versuche sind bei Benzaldehyd und Nitrobenzol von seiten

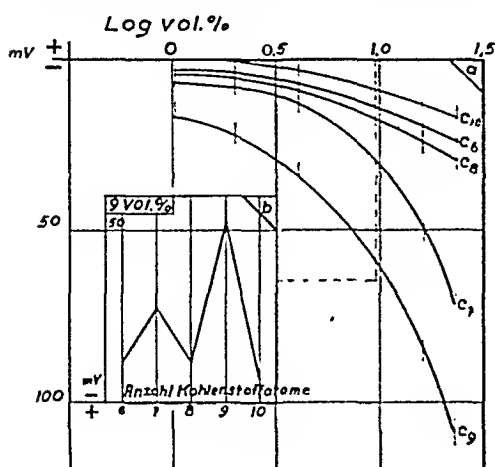


Fig. 31 b. Potentialdifferenzen im System: 0.0001-n KCl/A/Konz.KCl/A+x/0.0001-n KCl. A = o-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH, x = aliphatische prim. n-Alkohole.

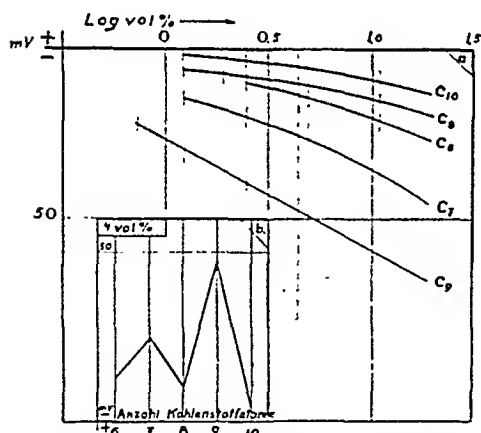


Fig. 31 c. Potentialdifferenzen im System: 0.0001-n KCl/A/Konz.KCl/A+x/0.0001-n KCl. A = o-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CHO, x = aliphatische prim. n-Alkohole.

der Alkohole neuartige spezifische Phänomene beobachtet worden. Siehe Fig. 31 a. Der gegenseitige Abstand der Salicylaldehyd-, Benzaldehyd- oder Nitrobenzol-Moleküle in der Grenzflächenstruktur dürfte also von derselben Größenordnung sein. Die Frage, ob diese Dipolmoleküle in der Grenzfläche liegend, stehend oder in einer Zwischenlage orientiert sind, ist schwer zu beantworten. Bei keinem der unzähligen Versuche über monomolekulare Filme ist man bis jetzt in Bezug auf die Lage eines Benzolringes in der Grenzfläche Wasser—Luft zu einem Aufschluss gekommen. ADAM u. A. (1938 a) behaupten wohl, dass gewisse Diphenole, insbesondere Verbindungen vom Typus  $\text{OH} \langle \text{Benzolring} \rangle \text{CH}_2$ —

$(\text{CH}_2)_x \text{CH}_2 \langle \text{Benzolring} \rangle \text{OH}$  flach liegen, aber für Benzolderivate im allgemeinen ist noch keine definitive Antwort auf diese Frage gegeben

worden. Dies hängt ja schliesslich mit der Tatsache zusammen, dass das Auftreten von monomolekularen Filmen erst bei einer bestimmten Kohlenwasserstoffanzahl möglich ist, so dass Untersuchungen über niederkettige Benzolderivate unmöglich sind. Die Frage von der Orientierung der Öldipole muss also vorläufig

unbeantwortet gelassen werden, wenn auch der Einlagerungseffekt der besprochenen Alkohole und anderer Stoffe auf ein Flachliegen hindeutet.

Phenol als Öl in der Standardkette gibt beim Einwirken von Alkoholen sehr kleine Potentialwerte, was auf die grosse gegenseitige Löslichkeit der Phenol- und Wasserphasen zu-

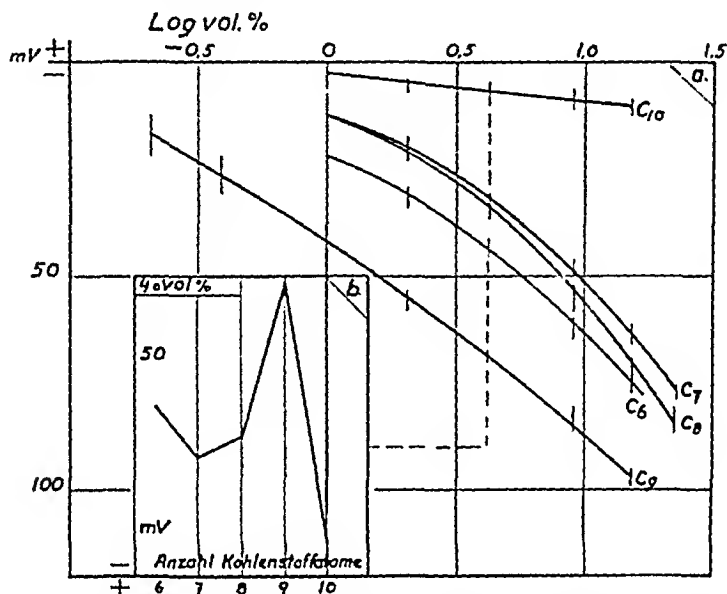


Fig. 31 d. Potentialdifferenzen im System: 0.0001-n KCl/A/Konz. KCl/A+x/-0.0001-n KCl. A =  $C_6H_5CH_2OH$ , x = aliphatische prim.n-Alkohole.

rückzuführen ist. Die entstehende Kontaktzone ist sicher als ziemlich diffus anzusehen. Grössere Potentiale geben aber die Kresole und Guajakol, Fig. 31 b. Hier ist eine kleine, aber ausgesprochene Spezifität für n-Nonylalkohol zu finden.

Es sind auch Versuche gemacht worden, den (immer nur hypothetischen) Raum zwischen den Dipolmolekülen zu »verengern«. Die folgenden Messungen der Standardketten mit o-Methoxybenzaldehyd zeigen die Wirkung verschiedener Alkohole. (Fig. 31 c.). Unter anderen Ölen ist der Benzylalkohol zu nennen, weil hier beim Einwirken von n-prim. Alkoholen die  $C_9$ -Verbindung *allein* eine spezifische Wirkung ausübt, siehe Fig. 31 d.

Erscheinungen der Spezifitätshemmung. Unter den beschriebenen Erscheinungen harret die Frage der speziellen räumlichen Einlagerung der  $C_7$ - und  $C_9$ -Alkohole in Salicylaldehyd-, Benzaldehyd- und Nitrobenzol-Grenzflächen hartnäckig einer be-

Versuche, den Einlagerungsraum zu verändern.

friedigenden Lösung. Alle Versuche, das Problem nach obigen Richtlinien anzugreifen, sind ohne Erfolg geblieben. Es müssten also neue Wege gefunden werden, um ein experimentelles Antasten des betreffenden Effektes zu ermöglichen. Dabei ist der Gedanke aufgetaucht, ob man durch eine intermittente Störung der Grenzflächenstruktur den Einfluss eingelagerter Alkohole verändern könnte. Bei diesen »Störungen« wurde in erster Linie an eine konstante Eindiffusion von Neutralmolekülen in die Ölphase gedacht, und zwar könnte man vielleicht hier von dem schon (Seite 76) erwähnten Jodeffekt Gebrauch machen. Es zeigt sich, dass der Alkoholeffekt auf die Kette:

0.0001-n KCl/Nitrobenzol/Ges. KCl/Nitrobenzol/0.0001-n KCl+Jod  
+ Alkohol

bei steigender Jodkonzentration stark abfällt. Hier wurde weiter die Beobachtung gemacht, dass beim Versuch mit der Kette:

0.0001-n KCl	Salicyl- aldehyd	Ges. KCl	Salicyl- aldehyd + Alkohol	0.0001-n KCl 0.0001-n J <sub>2</sub>
--------------	---------------------	----------	----------------------------------	---

eine sehr geringe J<sub>2</sub>-Konzentration in der einen Wasserphase die spezifische Wirkung der C<sub>7</sub>- und C<sub>8</sub>-Alkohole vollständig hemmte. (Siehe Fig. 32.)

Die spezielle Wirkung dieser Alkohole war also zum Niveau der anderen prim.-n-Alkohole herabgedrückt. Man könnte hier mit einer gewissen Berechtigung von einer *Spezifitätshemmung* sprechen. Ich glaube, dass hier Austauscherscheinungen von Salicylald.dipolen gegen non-polares J<sub>2</sub> eine Rolle spielen (Vgl. Seite 78), weil bei einem solchen Austausch die frei verfügbaren Zwischenräume keine Funktion des Abstandes Salicylald.-Salicylald., sondern des Abstandes Salicylald.-J<sub>2</sub> sein würde. Dies muss gänzlich veränderte Raumverhältnisse für die Einlagerung der Alkoholmoleküle mit sich bringen, und zwar in der Richtung einer Vergrößerung der Einlagerungsräume. Die Möglichkeiten einer »vollständigen« Verdrängung von Wasserdipolen sind also bei C<sub>7</sub>- und C<sub>8</sub>-Alkoholen wie bei dem Zyklohexanol in gewissem Grade herabgesetzt und werden von derselben Grösse sein wie bei anderen prim.-n-Alkoholen.

**Die Beziehung der Phasengrenzpotentiale zu physiologischen Systemen.** Man könnte sich fragen, wie weit sich die besprochenen Untersuchungen in rein physiologische Frage-

Eine Art  
»Spezifitäts-  
hemmung«.

stellungen einfügen lassen. Die ursprüngliche Absicht der Untersuchungen war, ein Versuch zum Angriff der Raumstruktur-

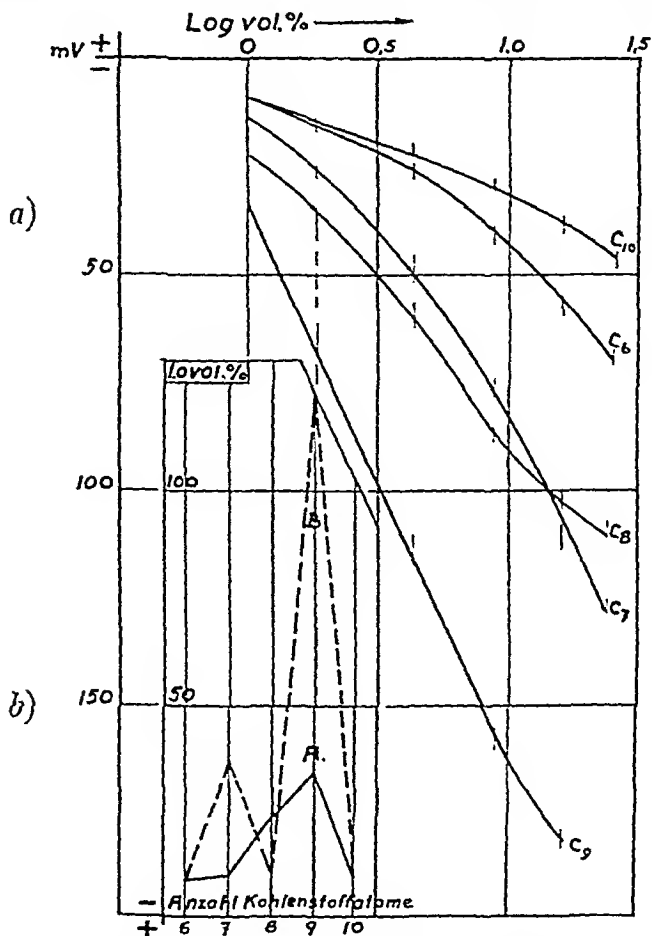


Fig. 32. Potentialdifferenzen im System: 0.0001-n KCl/A/Konz.KCl/A + x/0.0001-n KCl ÷ 0.0001-n J<sub>2</sub>. A = Salicylaldehyd, x = aliphatische prim.n-Alkohole. In Teil b) des Diagrams bezeichnet die gezogene Kurve, (A), die Pot. Werte bei 1 % Alkoholzusatz, die gestrichelte, (B), die Werte des entsprechenden Jodfreien Systems.

faktoren organischer Verbindungen zu machen. Voraussetzung Die Anknüpf-  
 hierbei war die Annahme, dass in flüssigen Zwischenflächen Mög- ung an phy-  
 lichkeiten zu einer Art Raumstrukturanalyse vorhanden seien, siologische  
 und dass hier unter speziellen Verhältnissen spezifische Phäno- Verhältnisse.  
 mene auftreten würden. Das Ergebnis der Experimente hat die  
 Berechtigung dieser Annahme bestätigt, wenn auch die Betracht-  
 ungen in qualitativer, nicht quantitativer Weise behandelt wor-  
 den sind. Die Verknüpfung dieser rein modellmässigen Versuche



mit physiologischen Problemen muss mit der allergrössten Vorsicht unternommen werden. Es besteht hier die Gefahr, die Resultate der Modellversuche zwangsläufig in das Gebiet der spezifisch physiologischen Erscheinungen einzureihen und den beobachteten Zwischenflächenphänomenen eine allgemein-physiologische Bedeutung zuzuschreiben. Zunächst erhebt sich die Frage, mit welchem Recht wir eine flüssige Zwischenfläche mit heterogenen physiologischen Systemen vergleichen können. Wie schon betont worden ist, spielen sich die meisten spezifischen physiologischen Erscheinungen in mikroheterogenem Milieu ab. Sind also die spezifische Wirkung eines Substrates auf das betr. Enzym oder Verankerung eines Haptens an den betr. Antikörper Erscheinungen derselben Art wie die spezifische Wirkung von Nonylalkohol auf die Zwischenfläche Nitrobenzol/Wasser? Mit anderen Worten, ist die spezifische Anlagerung einer organischen Verbindung an der Zwischenflächenstruktur eines solvatisierten Proteinmoleküls mit einer entsprechenden Anlagerung an eine makroheterogene, aus niedermolekularen Stoffen aufgebaute, flüssige Zwischenfläche direkt zu vergleichen? Aus der vorangehenden Diskussion über die Konstitution flüssiger Zwischenflächen (Vgl. Seite 58) ist hervorgegangen, dass die Annahme einer Art geordneter Zwischenflächenstruktur in gewissen Systemen als berechtigt anzusehen ist. Folglich lassen sich diese Zwischenflächenstrukturen in alle anderen heterogenen Systeme mit geordneten Grenzflächenstrukturen einreihen. Der einzige Unterschied zwischen dem Bauprinzip einer flüssigen Ober- oder Zwischenfläche und einer anorganischen oder organischen Kristalloberfläche z. B. liegt letzten Endes nur in der Bilanz der Dispersions- und Kohäsions-Kräfte des betreffenden Systems. Aus der Annahme einer Art geordneter Zwischenflächenstruktur folgt weiter, dass der physikalisch-chemische Hintergrund der spezifischen Adsorption an feste Grenzstrukturen auch für flüssige Zwischenflächen derselbe sein muss. Die verschiedenen Beobachtungen über die Gültigkeit des Langmuir-Isothermes bei Adsorption in flüssigen Zwischenflächen (Vgl. GIBBY und ADDISON 1936) stützen diese Annahme. Der Kernpunkt beim Adsorptionsmechanismus ist die Tendenz der zu adsorbierenden Moleküle, sich an gewisse Bezirke der Grenzstruktur des Adsorbens anzulagern. Das Prinzip dieser Anlagerung muss dasselbe sein, gleich, ob der betr. Adsorptionsbezirk in der Begrenzungsfläche eines solvatisierten hochmolekularen Proteins, in der Ober-

fläche eines anorganischen Kristallgitters oder in einer flüssigen Zwischenfläche lokalisiert ist. (Vgl. MARRACK 1938 c). Zwischen Adsorption in mikro- und makro-heterogenem Milieu besteht eigentlich nur ein formaler Unterschied, weil der Dispersitätsgrad des Adsorbens nur für den quantitativen Ablauf der Adsorption, nicht aber für den speziellen Adsorptionstypus bestimmend ist.

Der von Pt oder Rh katalysierte Zerfall von  $H_2O_2$ - oder  $HCOOH$ -Lösungen ist betr. seines spezifischen Mechanismus unabhängig davon, ob die Metalle als Blech oder in mikrodispersen Solvationszustände in den betr. Lösungen vorhanden sind. Die vergrößerte Wirkungsoberfläche in letzterem Falle bewirkt hier eine grössere Reaktionsgeschwindigkeit, aber der Typus, die »Spezifität« der Reaktion bleibt unbeeinflusst. SCHULMAN und Mitarb. (1933 und 1935) haben eingehende Untersuchungen über Enzymreaktionen in monomolekularen Filmen gemacht. Die Veränderungen des »natürlichen« Solvatisierungszustandes der Enzymmoleküle ändern an der Spezifität nichts. Über eine Antikörperreaktion in einem monomolekularen Film von Antigen berichtet CHAMBERS (1939).

Die spezifische Wirkung des n-Nonyl-Alkohols auf die Zwischenfläche Nitrobenzol/Wasser ist von deren Area unabhängig, sobald es sich um Veränderungen von makroheterogenen Größenordnungen handelt. (Bis zu einer Area von  $10^{-4} \text{ cm}^2$  ist der Effekt derselbe). Eine weitere Verkleinerung der Area der Zwischenfläche bis zur Größenordnung eines grobdispersen Kolloids würde sicherlich keine Änderungen des Effektes hervorrufen. Vergleicht man die spezifische Wirkung von Nonylalkohol in diesem mikroheterogenen System mit der erwähnten spezifischen Adsorption gewisser Azofarbstoffe an Alaun (Vgl. Seite 54) und weiter irgend eine Enzymreaktion, so ist es augenscheinlich, dass alle drei Systeme in Bezug auf die Prinzipien der selektiven Adsorption gleichartig sind. Weiter können natürlich Einwände gegen das Parallelisieren physiologischer Reaktionen und beobachteter Grenzpotentialschwankungen gemacht werden. Hier soll sogleich wieder darauf hingewiesen werden, dass das Registrieren von Grenzpotentialänderungen beim Einwirken organischer Stoffe nur als ein *Reagenz* für den speziellen Ablauf der Zwischenflächenadsorption benutzt worden ist. Dass die Grenzpotentiale in hohem Grade von dem Auftreten spezifischer Einlagerungsphänomene beeinflusst werden, wo andere Reagenzien der Grenzflächenstruktur, z. B. Messen der Zwischenflächenspan-

nung, versagen, ist schon S. 92 betont worden. Es kann also mit einer gewissen Berechtigung behauptet werden, dass das Messen von Grenzpotentialänderungen in flüssigen Zwischenflächen organischer Stoffe/Wasser bei Einwirkung gewisser Verbindungen einen Beitrag zur Kenntnis spezifischer Reaktionen im physiologischen System liefert, und zwar die Bestätigung des Einflusses von Raumstrukturfaktoren. Ausserdem bestehen auch gewisse Möglichkeiten, die im nächsten Abschnitt behandelt werden sollen, auf Basis von Grenzpotentialerscheinungen einige Beiträge zu einer Theorie der primären Geruchswirkung zu liefern.

---

## V.

### Versuch einer Theorie der primären Riechmechanismus.

Aus der vorangehenden Besprechung ergeben sich nun die Richtlinien für eine spezielle Behandlung der Riechstoffe und ihrer Wirkungsweise. Es gilt dabei zunächst, nach den Prinzipien, die im Abschnitt III entwickelt worden sind, einige Anhaltspunkte festzulegen, um untersuchen zu können, inwieweit die speziellen Wirkungen der Verbindungen auf verschiedene molekulare Wirkungsbezirke zurückzuführen sind. Nun sind jedoch die Möglichkeiten einer umfassenderen Übersicht von Ringstruktur- bzw. Gruppeneinflüssen recht begrenzt, weil die Angaben der Literatur über Geruch und Geschmack organischer Verbindungen in systematischer Hinsicht sehr mangelhaft sind. Bei den im BEILSTEIN-Handbuch behandelten Stoffen sind be- Die Literatur.  
sonders die verschiedenen Geruchstypen sehr unzulänglich besprochen, meist durch ganz allgemeine Ausdrücke, beispielsweise als »erfrischend«, »süßlich«, »fruchtähnlich« usw. bezeichnet. Man ist daher hauptsächlich auf die Spezialuntersuchungen über den Geruch ganz bestimmter Verbindungsklassen angewiesen. Wertvolle Angaben hierzu finden sich — besonders für Parfümstoffe — in SCHIMMELS Berichten und in »The American Perfumers«. Einige Arbeiten, die besondere Aufmerksamkeit verdienen, sind die von J. v. BRAUN und Mitarbeitern in der Serie »Geruch und Konstitution« (1921—31) und die Monographie »Die Riechstoffe« von G. COHN (1924). Um die physikalisch-chemische Problemstellung dieses Abschnittes nicht in den Hintergrund treten zu lassen, habe ich mich auf einige Typenbeispiele aus diesen und anderen Literaturquellen beschränkt.

**Eine Einteilung der Riechstoffe.** Bei der vielseitigen »Analyse« organischer Verbindungen seitens der Rezeptoren der Riechschleimhaut ist ein durchgehendes Prinzip zu beobachten, dessen allgemein-physiologische Gültigkeit schon in anderem Zu-

sammenhang besprochen worden ist, nämlich: je geringere Möglichkeiten es für das direkte reaktive Eingreifen der Moleküle gibt, desto grösser ist die Anzahl der Geruchsvarianten der verschiedenen Derivate einer Verbindungsklasse. Bei den Derivaten einer Verbindung mit ausgesprochen reaktiven Eigenschaften ist dagegen im allgemeinen ein und derselbe Geruchstypus — mit geringfügigen Modifizierungen — wahrzunehmen. Hier taucht die Frage nach der »Ausdehnung« (bzw. »Abgrenzung«) des molekularen Wirkungsbezirkes auf. Mit aller Vorsicht gebraucht könnte diese Arbeitshypothese, deren heuristischer Wert nochmals betont werden muss, als Ausgangspunkt einer präliminaren Einteilung der Riechstoffe dienen. Es gilt hier vor allem, sich darüber klar zu werden, welche von den Teilstrukturen einer geruchgebenden Verbindung bei dem Rezeptionsvorgang *wahrscheinlich mehr beteiligt sind als andere*.

Bei gewissen Verbindungen, die *in vitro* grosse reaktive Möglichkeiten besitzen, ist von vornherein die Wahrscheinlichkeit ziemlich gross, dass die speziellen Eigenschaften des reaktiven Bezirkes auch für die Chemozeptorenbeeinflussung bestimmend sind. Unter flüchtigen Oxydations- und Reduktionsmitteln sind in dieser Hinsicht interessante Beobachtungen zu machen.

*Oxydationsmittel* besitzen allgemein einen Geruch, der als stechend oder »chlorähnlich« bezeichnet werden kann. Beispiele sind  $O_3$  oder Stickoxyde, Chloroxyde,  $OsO_4$ !, und unter den organischen Verbindungen flüchtige Chinone.

*Reduktionsmittel* haben im allgemeinen einen sehr unangenehmen schwer zu beschreibenden Geruch, wofür  $H_2S$ ,  $H_2Se$ ,  $H_2Te$ , Borhydride und andere als Beispiel anzuführen wären. Unter organischen Verbindungen sind vor allem gewisse Metallalkylverbindungen und SH-Verbindungen zu nennen. Dass der Schwefel als solcher in den letzteren Verbindungen nicht für den Geruch bestimmend ist, zeigt das Verhalten gereinigter Thioäther, deren Geruch gewissermassen als »ätherisch« zu bezeichnen ist. Ohne Zweifel ist der Merkaptangeruch auf die leicht zu oxydierende SH-Gruppe zurückzuführen. Die Metallalkyle sind übrigens besonders instruktiv. Bei den leicht oxydierbaren Alkylderivaten des Arsens und Tellurs z. B. ist ein äusserst penetranter Geruch zu beobachten: die schwer oxydierbaren Alkylverbindungen des Bleis und des Quecksilbers dagegen sind beinahe geruchlos.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Gerüche flüchtiger Oxyda-

Die »Abgrenzung des molekularen Wirkungsbezirkes.«

Oxydations- und Reduktionsmittel.

tions- und Reduktionsmittel aller Art primär durch direkt reaktive Angriffe auf gewisse Komponenten des Chemozeptorensystems zustandekommen. Das einzig Gemeinsame der Vertreter beider Klassen ist doch letzten Endes deren Vermögen, als Elektronenspender bzw. Elektronenakzeptoren zu dienen.

Auch bei den *Verbindungen mit reaktivem Halogen* steht wahrscheinlich der charakteristische »ätzende« oder »stechende« Geruch in irgend einem Zusammenhang mit dem reaktiven Eingreifen des Halogenatoms. Beispiele sind — ausser den Halogenwasserstoffen — organische Verbindungen vom Benzylehlorid- und Chloracetontypus, sowie verschiedene Säurehalogenide. Es mag dahingestellt bleiben, ob der ätzende Geruch durch Einwirkung auf andere Elemente der Riechschleimhaut als die Geruchsrezeptoren zustandekommt (Reizung des Trigeminussystems) und ob freigemachte Wasserstoffionen dafür verantwortlich sind. Bei den Acylhalogeniden — wie auch bei  $\text{POCl}_3$  — deutet jedenfalls der ungewöhnlich anhaftende Geruch auf irreversible Eingriffe im Sinne einer Acylierung hin. Überhaupt besteht kein Zweifel darüber, dass hier die Reaktivität des Halogenatoms ausschlaggebend ist. Von den Verbindungen der Reihe:  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COCl}$  —  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COCH}_2\text{Cl}$  —  $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ , z. B., riechen die beiden ersteren scharf säurechlorid- bzw. chloracetonähnlich, während die letztere einen allgemein ketonähnlichen Geruch besitzt. Ein reaktives Eingreifen von seiten des Cl-Atoms ist in letzterem Falle auch nicht zu erwarten.

Verbindungen vom Benzylehloridtypus.

Zu derselben Geruchsklasse gehören andere ungemein reaktionsfähige Verbindungen, wie *Ketene*, *Isocyanate*, *Diazomethan*, *Akrolein* u. a., für deren scharfen Geruch bestimmte Additions- bzw. Alkylierungsreaktionen verantwortlich gemacht werden können.

Die *Amine* nehmen eine Sonderstellung ein. Das N-Atom ist hier bestimmt als »Wirkungsgruppe« anzusehen, weil der charakteristisch fischähnliche Geruch sowohl bei primären als bei sekundären und tertiären Aminen auftritt und besonders, weil der verschiedenartige Umbau des CH-Gerüsts der Moleküle vollzogen werden kann, ohne den Geruchstypus wesentlich zu verändern. Eine Voraussetzung für das Zustandekommen des »Aminengeruchs« ist aber, dass das N-Atom nicht direkt an aromatischen Ringsysteme oder aromatenähnlichen Heterozyklenstrukturen angeschlossen ist. Der Geruch des Anilins und seiner Alkylderivate deutet darauf hin, dass hier durch die mesomere

Amine.

Beteiligung des freien Elektronenpaares am N-Atom die speziellen Bedingungen für den Aminengeruch wesentlich verändert worden sind. Es könnte hier einfach die Basizität mitspielen. Doch ist der Anilingeruch vielmehr ein Beispiel dafür, wie bei abgeschwächter Reaktivität einer Gruppe der spezielle Bau des Molekulargerüsts als Geruchsfaktor an Bedeutung zunimmt. Es ist auffallend, dass unter den aromatischen und heterozyklischen Aminen die verschiedensten charakteristischen Geruchstypen vorkommen. Eine durchgehende »Aminen-Nuance« ist im allgemeinen hier nicht wahrzunehmen. Unterbricht man aber die elektromere Wirkung des N-Atoms durch Hydrierung oder durch Einschleiben von  $-\text{CH}_2-$  zwischen N und Ringstruktur so kehrt der Aminengeruch zurück. Beispiele sind die aminenriechenden Tetra- und Hexahydroanilin, Benzylamin, Phenylisopropylamin.

Die Wirkungsgruppe ohne direkt reaktive Eigenschaften.

Das Verhalten der jetzt besprochenen Beispiele von Verbindungen mit ausgeprägten Wirkungsgruppen lässt auf einen Elektronenaustausch beim Einwirkungsvorgang schliessen. Bei der Hauptmenge der eigentlichen Riechstoffe sind aber die Möglichkeiten, dass sich der primäre Rezeptorenreiz elektronenaustauschgemäss vollzieht, weit geringer. Was die Carbonsäuren betrifft, so besteht hier noch die Möglichkeit, dass pH-Verschiebungen eine primäre Rolle spielen, doch deuten die grossen Variationen im Geruchstypus verschiedener Homologe und Alkylderivate darauf hin, dass hier andere Faktoren mitwirken. Man kann eine grosse Klasse von Riechstoffen abgrenzen, in der bestimmt gewisse Molekularbezirke eine Art »Wirkungsgruppen« darstellen, ohne dass jedoch die Voraussetzungen für eine reaktive Einwirkung gegeben sind. Bei allen diesen Verbindungen ist ein ausgeprägter Einfluss auf den Geruchstypus *seitens der ganzen Molekularstruktur* zu beobachten.

Die Alkohole, Aldehyde, Ketone, Carbonsäuren, Ester und Laktone der aliphatischen und alizyklischen Reihen sind hierfür typisch. Die betr. polaren Gruppen, in verschiedenen CH-Strukturen eingekoppelt, verwandeln den undezidierten Geruch der entsprechenden Kohlenwasserstoffe in für jede Gruppe *und* die betreffende CH-Struktur charakteristischer Weise. Es scheint — allerdings bildlich — als ob die polaren Gruppen die latenten Möglichkeiten der verschiedenen CH-Strukturen zur Geruchswirkung »entwickeln«. Der Einfluss des räumlichen Baues der ganzen Struktur kann durch die verschiedensten Beispiele veranschaulicht werden.

Der Einfluss der Raumstruktur.

Von 1—3-Dimethylzyklohexanon-2 hat v. BRAUN (1926) vier Isomeren dargestellt: die 1d—3d, die 1l—3l-Verbindungen und deren Razemat, und dazu die innerkompensierte inaktive 1l—3d-Verbindung. Trotzdem der induktive Einfluss der beiden Methyl- bei diesen Stoffen höchst wahrscheinlich derselbe ist, unterscheiden sich die vier Verbindungen im Geruch deutlich voneinander! Bei den mehrgliedrigen zyklischen Ketonen und Laktonen ist der Einfluss der Raumstruktur auf den Geruchstypus besonders ausgeprägt, RUZICKA (1926). Die Keton- oder die Laktongruppen sind allerdings hier für die »Entwicklung« des Geruchstypus nötig, aber für das Auftreten der speziellen Moschus- bzw. Zibetnuancen sind eine bestimmte Anzahl C-Atome im Ring ausschlaggebend (14—18).

Bei isomeren Alkylderivaten ein und derselben Struktur lassen sich oft deutliche Unterschiede im Geruch beobachten. V. BRAUN, KRÖPER und WIENHAUS (1929) berichten über eine deutlich wahrnehmbare Änderung des rautenölähnlichen Geruchstypus in der Reihe:  $C_9H_{19}COCH_3$ — $C_8H_{17}COC_2H_5$ — $C_7H_{15}COC_3H_7$ ,  
— $C_6H_{13}COC_4H_9$ — $C_5H_{11}COC_5H_{11}$ .


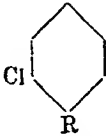
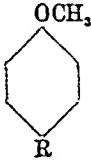
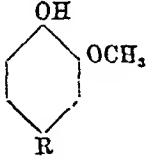
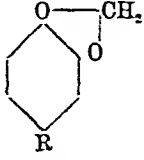
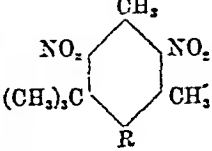
Das Zusammenwirken mehrerer Substituenten ist bei den gesättigten Aliphaten und Alizyklen von dem gegenseitigen Abstand und der Natur der Gruppen abhängig. Erstens kann die Flüchtigkeit herabgesetzt werden, was zu Geruchlosigkeit führt (Oxysäuren!), zweitens können 2 Gruppen einen spez. gegenseitigen Einfluss auf die Molekularenergetik ausüben, was bei bestimmten Stellungen der Gruppen zu charakteristischen Geruchstypen führen kann. Das in der allgemeinen Übersicht erwähnte Verhalten der tert. Alkanole soll hier nochmals diskutiert werden: Kampher- bzw. Pfeffermünzgeruch tritt im allgemein auf, wenn in einem gesättigten Kohlenwasserstoffgerüst eine —CHOH— oder —CO-Gruppe in der Nähe eines stark beanspruchten C-Atoms steht. Beispiele sind bei HALLER und CORNUBERT (1913—15) in grosser Anzahl zu finden. Manchmal schlägt der Geruch beim Austausch von —CHOH— gegen —CO— von Kampher nach Pfeffermünz um, manchmal ist es umgekehrt. Bei dieser Verbindung lässt sich überhaupt oft ein ständiger Übergang von dem einen zum anderen Geruchstypus beobachten. Der Abstand von —CHOH— oder —CO— zu dem tert. oder iso-C-Atom ist von entscheidendem Einfluss auf den charakteristischen Geruch.

Die Natur der an das C-Atom gekoppelten Alkylgruppen scheint hier von untergeordneter Bedeutung zu sein, und, wie

Mehrere Substituenten.



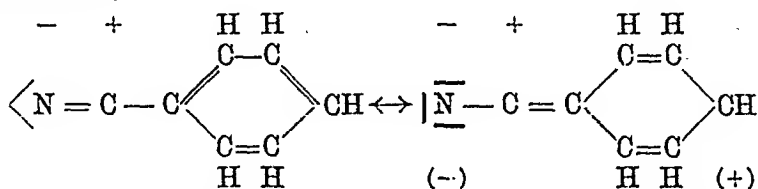
## Geruch und -E-Wirkung bei gewissen Benzolderivaten.

Beispiele verschiedener Grund- gerüste	R =	Geruchstypus
	$-\text{CHO}$ $-\text{CN}$ $-\text{NO}_2$ $-\text{N}_3$ $-\text{N}-\text{NO}$ $\dot{\text{C}}_2\text{H}_5$	Bittermandelölähnlich
	$-\text{CHO}$ $-\text{CN}$ $-\text{NO}_2$	Bittermandelölähnlich
	$-\text{CHO}$ $-\text{CN}$ $-\text{COOC}_2\text{H}_5$ $-\text{NO}_2$ $-\text{N}_3$	Anisähnlich
	$-\text{CHO}$ $-\text{CN}$ $-\text{NO}_2$ $-\text{N}_3$	Vanille-ähnlich
	$-\text{CHO}$ $-\text{CN}$ $-\text{NO}_2$ $-\text{N}_3$	Heliotropähnlich
	$-\text{CHO}$ $-\text{COCH}_3$ $-\text{NO}_2$ $-\text{N}_3$	Moschusähnlich.

schon oben angedeutet wurde, lassen sich dieselben gegen Halogenatome auswechseln. Das Wesentliche scheint hier vielmehr die *Anzahl* der Gruppen zu sein, also die spez. Valenzbeanspruchung. HÜCKEL (1940 f) weist darauf hin, dass tert. C-Strukturen



Die Verhältnisse komplizieren sich aber auf Grund der inneren Mesomerie der CN-Gruppe, die sich in der Schwebe zwischen  $\text{N} \equiv \text{C}$ — und der polaren Struktur  $\text{N}^+ = \text{C}^-$  befindet. Man könnte vielleicht den Grenzformeln I und II noch die Strukturen III und IV zur Seite stellen:

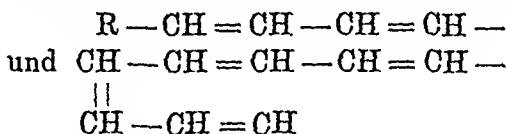


In irgendwie analoger Weise ( $\rightarrow$ E) wirkt wahrscheinlich die Azidgruppe und die Nitrosaminstrukturen. Man könnte also bei den Phenyl-Nitrosaminen, die eine azidähnliche Struktur besitzen, die Geruchswirkungen der Azide erwarten. Unter den spärlichen Angaben der Gerüche dieser und analoger Verbindungen findet man, dass das N-Äthylphenylnitrosamin tatsächlich Bittermandelölgeruch besitzt, wie Phenylazid.

Die Bedeutung des elektromeren Einflusses der verschiedenen Substituenten in Benzolderivaten ist in etwa einer Arbeit von A. MÜLLER (1936) berührt worden. MÜLLER hält das *Dipolmoment* der Riechstoffe dieser Verbindungsklasse für die speziellen Geruchswirkungen verantwortlich, obwohl er seinen Gedankengang, wie eigentlich das Dipolmoment sich zur Frage der inneren Molekülstruktur und der  $\pi$ -Elektronenverteilung verhält, nicht weiter entwickelt hat. Wenn das Dipolmoment mit der Geruchswirkung von z. B. Nitrobenzol in Zusammenhang gebracht werden soll, so ist es jedoch die Differenz der Momente aromatisch und aliphatisch gebundener Nitrogruppen, die hier massgebend ist. Diese Differenz  $\mu_{\text{NO}_2, \text{ar}} - \mu_{\text{NO}_2, \text{alif}} = 0.64 \cdot 10^{-18}$  ist gerade das Reagens der mesomeren Beteiligung der Nitrogruppe, weil das elektromere Aufnehmen von Elektronen aus dem Aromatengerüst einen Zuwachs des ursprünglichen Momentes  $\mu_{\text{NO}_2, \text{alif}} = 3.29$  auf  $\mu_{\text{NO}_2, \text{ar}} = 3.93$  zur Folge hat. (Vgl. PAULING 1940 e.) Diese Überlegung gilt auch für die elektrische Asymmetrie einer Gruppe an sich und steht mit ihren induktiven Eigenschaften in gewissem Zusammenhang.

Weiter ist das Verhalten der ungesättigten Kette  $-\text{CH}=\text{CH}-$ , als Seitenkette in Benzol eingekoppelt, von Interesse. Der Geruch von Styrol  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{CH}_2$  ist von dem benzolähnlichen Äthylbenzolgeruch völlig verschieden. Man könnte hier erwarten, dass eine (selbst Doppelbindungen enthaltende) Gruppe in die Seitenkette in  $\omega$ -Stellung eingekoppelt, als Konjugationspartner wirken würde (Vgl. PAULING, 1940 f), was zu gleichartigen Mesomerieverhältnissen des  $\omega$ -Nitrostyrol, Zimtaldehyd und Benzylidenazeton führen würde. Tatsächlich rie-

chen alle diese Verbindungen zimtähnlich. Ein durch die ungesättigte Seitenkette gesandter  $\pm$ E-Einfluss, z. B. von  $\omega$ -ständigem Halogen oder Alkoxy, äussert sich in demselben hyazinthenähnlichen Geruch. Wie zu erwarten ist, wird dieser elektromere Einfluss und ebenso der Zimt- oder Hyazinthengeruch durch Hydrierung der Seitenkette aufgehoben. Es wäre eine interessante Aufgabe, das Verhalten der aliphatischen Verbindungen mit konjugierten Doppelbindungen mit den Aromaten zu vergleichen, weil man von der Kombination der Strukturen:



mit denselben Konjugationspartnern eine analoge Wirkung erwarten dürfte. Unter den spärlichen Angaben über den Geruchstypus der ungesättigten Aliphate findet man, dass Sorbinsäurenitril,  $\text{CH}_3 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH} = \text{CH} - \text{CN}$ , zimtartig riecht, was mit dieser Auffassung in Einklang steht.

Rein induktive Gruppeneinflüsse sind für die Geruchswirkung der Aromatenderivate von geringer Bedeutung. So riechen z. B. die 3-, 4-, 5-, 6-, 7- und 8-Methylcumarine alle cumarinähnlich (Cohn 1924 b). Überhaupt ist der Einfluss von kerngebundenem Alkyl meist sehr unbedeutend, sobald es sich um *n*-primäre Ketten handelt. Alle Glieder der Serie Benzol—Methylbenzol — bis *n*-Oktylbenzol riechen nach der Muttersubstanz. Dagegen scheinen *verzweigte Alkylketten* einen speziellen Einfluss zu haben, wie man beim Vergleichen des Geruchs von *p*-Methyl-*n*-Propylbenzol und Cymol beobachten kann. Der Zusammenhang zwischen dem prägnanten Moschusgeruch von 1-3-5-Trinitro-*t*-Butyl-Toluol und -Xylol und dem *t*-C-Atom entspricht in irgend einer Weise dem Verhalten der kampher- und pfeffermünzähnlich riechenden Verbindungen der aliphatischen Reihe. (Vgl. Seite 117.) Die speziellen Raumstruktur- und Rotationsverhältnisse der *t*-C-Atomstrukturen spielen hier sicherlich eine besondere Rolle.

Die angeführten Beispiele aus der quantitativ äusserst reichhaltigen Literatur der Riechstoffe geben einigermassen Aufschluss über die Natur der Einflüsse der geruchbestimmenden Strukturaktoren. Je nach den speziellen Eigenschaften der polaren Gruppen und der Struktur des C-H-Gerüsts wird also sozusagen die Abgrenzung der empfindlichen Stellen im Molekül festgelegt. Nehmen wir z. B. die Reihe:

I  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{Cl}$ , II  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}_2$ , III  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CHO}$ , IV  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OH}$ ,  
V  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ , VI  $\text{C}_6\text{H}_6$ .

In I ist das Cl-Atom locker gebunden und ist sicher in rein reaktivem Sinne für den stechenden Geruch verantwortlich. Das aliphatisch gebundene  $-\text{NH}_2$  in II bewirkt wahrscheinlich reaktiv den charakteristischen Aminengeruch. In III ist der Bittermandelölgeruch an den  $-\text{E}$ -Effekt der  $-\text{CHO}$ -Gruppe gebunden. Die Gruppe selbst lässt sich gegen andere Konjugationspartner, wie  $-\text{NO}_2$  austauschen; der geruchbestimmende Faktor ist hier die spezielle  $\pi$ -Elektronenverteilung in der Benzolstruktur. IV hat die Eigenschaften eines aliphatischen Alkanols und ist für Alkylsubstitution im Kern empfindlich. Die OH-Gruppe wirkt hier rein induktiv. Der Geruch von V und VI wird ausschliesslich durch die  $\pi$ -Elektronenstruktur und räumliche Faktoren bestimmt.

Es ist interessant, in diesem Zusammenhang auf die klassische Arbeit von RUPE und MAJEWSKI (1900) hinweisen zu können, weil diese den ersten ernstlichen Versuch darstellt, dem Geruchsproblem eine begründete chemische Basis zu geben. Die Autoren haben die Aufmerksamkeit auf den Einfluss gewisser Gruppen, »Osmophoren«, gelenkt, die für den Geruch bestimmend sind. Als Osmophoren nennen sie z. B.  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{CHO}$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{COOCH}_3$  u. s. w. Dass die Diskussion des Einflusses dieser Gruppen und Teilstrukturen nicht über eine allgemeine Systematik hinaus kam ist verständlich, weil zu jener Zeit die innere Struktur organischer Verbindungen noch der Aufklärung harrete. Dies betrifft auch die Osmozeptorentheorie von RŮZICKA (1920).

Die Kontinuität.

Kann nun nach der obigen Besprechung eine von einheitlichem Gesichtspunkt ausgehende Zusammenfassung gemacht werden? Ist bei den Riechstoffen, wie bei den adequate Reizmitteln des Gesichts- und Gehörsinnes eine definierte Kontinuität der Reizqualität zu entdecken? Stellt man sich diese als eine Art von »Geruchsspektrum« vor, in das sich alle riechenden Verbindungen »monochromatisch« eingliedern, so ist die Antwort bestimmt: nein. Aus obiger Besprechung geht hervor, dass die »Analyse« der Riechstoffe von seiten des Rezeptorensystems *sich nicht nach einem, sondern nach mehreren Struktur Faktoren richtet*. Eine Geruchswahrnehmung ist somit — bildlich gesprochen — das Resultat eines »polychromatischen« Primärreizes, der mit der Empfindung des Farbtones eines, verschiedene Wellenlängen absorbierenden Farbstoffes oder eines zusammengesetzten Klangakkordes zu vergleichen ist.

Eine Art Kontinuität ist jedoch zu erkennen. *Es ist offensichtlich, dass die Analyse einer Verbindung von seiten des Rezeptorensystems sich primär auf die molekularen Bezirke grösster Elektro-*

nen- oder Protonenbeweglichkeit richtet und, je weniger diese Beweglichkeit ausgeprägt ist, desto mehr fällt die Bedeutung der Raumstruktur des Moleküls als Geruchsfaktor ins Gewicht.

Dies ist also eine verallgemeinerte Erweiterung des schon erwähnten Prinzips der »reziproken Bedeutung« der Reaktivität und der Raumstruktur für die Geruchsempfindung einer Verbindung (Vgl. S. 112).

Eine schematische Darstellung wäre folgende:

Grad der Bedeutung der Raumstruktur als Geruchsfaktors.	Typenbeispiele	Bemerkungen
	Grössere aliphatische u. alizyklische C-H-Strukturen	Ausgeprägte Raumwirkung
	Aromatische C-H-Strukturen mit grösseren Alkylgruppen	$\pi$ -Elektroneneinfluss und Raumwirkung
	Aliphatische, alizyklische und aryl-aliphatische	Zusammenwirken zwischen polaren Gruppen u. Rest der Molekülstruktur.
	Alkohole,	Geruchsunterschied bei optischen Isomeren wahrnehmbar.
	Ketone,	Protonbeweglichkeit! pH?
	Aldehyde,	— E und + E-Wirkung.
	Laktone,	
	Carbonsäuren	
	Aromatische Nitroverbindungen,	
	Aldehyde,	
	Ketone,	
	Ester,	
	Äther,	
	Phenole,	Protonbeweglichkeit bei OH. Herabgesetzte Aminwirkung (+ E!).
	Amine	
	Aliphatische, alizyklische und aryl-aliphatische	
	Amine	Gruppenwirkung sicher reaktiv. pH?
	Nitrile	Reaktives Eingreifen.
	Alle Isonitrile	
	Isocyanate	, ,
	Isothiocyanate	, ,
	Acylhalogenide	Acylierung?
	Verbindungen vom Typus Benzylchlorid	Reaktives Eingreifen.
	Akrolein	
	Oxidations- und Reduktionsmittel	
	HCl, PCl <sub>3</sub> , CrOCl <sub>2</sub> u. s. w.	, ,
Grad der Elektronen- oder Protonenbeweglichkeit in bestimmten Bezirken im Molekül.		

Das hier aufgestellte Schema ist nur als ein Versuch anzusehen, die besprochene Kontinuität zu veranschaulichen. Hierzu müssen noch einige ergänzende Bemerkungen gemacht werden. Das, was der Einfachheit halber als »Elektronen- und Protonenbeweglichkeit« bezeichnet ist, bezieht sich auf die molekularen Eigenschaften, die auf die Polarisierbarkeit im weitesten Sinne zurückgeführt werden können, also von der zu Elektronenaustausch führenden Reaktivität einzelner Atome bis zu der Verschiebbarkeit von  $\pi$ -, — in zweiter Linie  $\sigma$ -Elektronen. Weiter stellt, was als »Raumstruktur« bezeichnet ist, die räumliche Abgrenzung *aller* Teilbezirke in rein topographischem Sinne dar. Additive Eigenschaften der räumlichen Ausdehnung einzelner Teilstrukturen im Zusammenhang mit Geruchswirkung kommen nicht in Frage. Die Annahme der Existenz einer Art von »Geruchsparachor« ist auf das bestimmteste abzulehnen.

Es soll jetzt der Versuch gemacht werden, auf Basis der geruchbestimmenden Strukturfaktoren in organischen Verbindungen die Prinzipien des Rezeptionsvorganges zu rekonstruieren. Dies bedeutet, dass man nun dazu Stellung genommen hat, ob man bei dem Geruchsmechanismus völlig unbekannte bzw. neuartige Phänomene in Rechnung ziehen soll oder die betr. Vorgänge auf bekannten physikalisch-chemischen Prinzipien basieren. Die Ausführungen in den Abschnitten II und III über die allgemeinphysiologische Stellung des Geruchsinnes und dessen Klassifizierung organischer Verbindungen sprechen definitiv für die Berechtigung der letzteren Auffassung. Demnach könnte also jetzt eine physikalisch-chemische Deutung des Rezeptionsvorganges gegeben werden. Diese Aufgabe lässt sich nur in groben Zügen durchführen und umfasst eine Untersuchung der Möglichkeiten bei gewissen physikalisch-chemischen Systemen, von den »geruchgebenden« Strukturfaktoren in charakteristischer Weise beeinflusst zu werden. Danach soll diskutiert werden, inwieweit gewisse prinzipielle Lösungen dieser Fragestellung auch physiologisch annehmbar sind.

**Eine physikalisch-chemische Deutung des Rezeptionsmechanismus.** In dem Sammelwerk von HENNING »Der Geruch« ist eine umfangreiche Zusammenstellung der bisherigen Hypothesen des Geruchsmechanismus zu finden. Es sind auf diesem Gebiet die verschiedensten Vorschläge gemacht worden, ohne dass jedoch bis jetzt eine stichhaltige Arbeitshypothese geschaf-

fen worden ist. Typisch ist, dass z. B. in dem Lehrbuch der Physiologie von HÖBER die Besprechung des Gehörs- und des Gesichtssinnes zusammen etwa 80 Seiten umfasst, während der Geruchssinn auf drei Seiten behandelt wird. Jene kurze Besprechung umfasst als Extrakt der bisherigen Untersuchungen auf diesem Gebiete hauptsächlich die klassischen olfaktometrischen Messungen von ZWAARDEMAKER, die Reizschwellenwerte einiger Riechstoffe und eine Diskussion der Ermüdungserscheinungen. Bei folgendem Entwurf einer physikalisch-chemischen Theorie der primären Reizvorgänge schien es daher angebracht, die Übersicht der meisten bisherigen Untersuchungen den Sammelwerken zu überlassen. Ausser dem Buch von HENNING erweisen sich die Monographie »Smell, Taste and allied Senses in Vertebrates« von PARKER (1922) und der Abschnitt »Der Geruchssinn beim Menschen« im Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie — von F. B. HOFMANN bearbeitet — als ausgezeichnete Zusammenstellungen.

Bei der weiteren Besprechung der Riechstoffe gehen wir nun von folgenden Anforderungen an das Rezeptorensystem des Geruchssinnes aus:

Die Anforderungen an ein Rezeptorensystem.

Erstens muss es aus gewissen Komponenten zusammengesetzt sein, die bei Einwirkung ausgesprochen reaktiver Verbindungen als Reaktionspartner dienen können.

Zweitens muss es von Verbindungen mit gewisser  $\pi$ -Elektronenverteilung in charakteristischer Weise beeinflusst werden können.

Drittens muss es für die Raumstruktur der einwirkenden Verbindungen empfindlich sein.

Dazu kommt noch eine weitere Forderung. Das System muss die Möglichkeit besitzen, jene Eingriffe in eine für jeden Stoff charakteristische Beeinflussung des angeschlossenen Reizleitungssystems umzuwandeln. *Der chemische Reiz soll in spezielle bioelektrische Störungen transformiert werden, die als Aktionspotentiale zum Zentralnervensystem weitergeführt werden können.*

Ein physikalisch-chemisches System, das all diesen Anforderungen am meisten entsprechen würde, wäre die *Zwischenflächenzone eines Zweiphasensystems*. In Abschnitt IV ist gezeigt worden, wie Verbindungen *aller Art* in charakteristischer Weise in das Grenzflächengebiet zwischen organischen Verbindungen und Wasserlösungen eingreifen und dabei in ziemlich kleinen Konzentrationen beträchtliche Störungen der elektrischen Verhält-

Ein geeignetes System.



nisse des Systems hervorrufen. Der Gedanke liegt nahe, den Primäreingriff der Riechstoffe mit einer Art *spezifischer Adsorption zusammenzustellen und die bioelektrischen Erscheinungen des Rezeptorensystems mit dem Gebiet der Zwischenflächenpotentiale zu verknüpfen.*

Vieles spricht für die Berechtigung dieser Auffassung. Durch die geeignete Auswahl eines (oder mehrerer) Komponenten der organischen Phase eines Ölkettensystems würde es möglich sein, ein Rezeptorenmodell zu schaffen, dessen Eigenschaften sich denen des Geruchsrezeptorensystems ziemlich eng anschliessen. Als Substrat der reaktiven Einwirkung Oxydantia und Reduktantia könnte eine Verbindung mit Redoxeigenschaften benutzt werden, z. B. ein Polyphenolderivat oder eine SH-Verbindung. Weiter würden anwesende OH- oder NH<sub>2</sub>-Gruppen Verbindungen mit labilem Halogen ein geeignetes Substrat für reaktive Einwirkung bieten. Für »chemische« Einwirkung gewisser  $\pi$ -Elektronenstrukturen können vorläufig zwei Vorschläge gemacht werden. Erstens könnte die Bildung von Molekülverbindungen von z. B. Nitrobenzol-Anilin-Typus durch die Anwesenheit stark polarisierender Gruppen in der organischen Phase ermöglicht werden. (Ein Beispiel hierzu ist die polarisierende Wirkung von Tetranitrometan auf Benzolderivate und Polyenstrukturen.) Zweitens könnten gewisse ungesättigte Strukturen auf einwirkende Verbindungen mit mehr oder weniger entkoppelten  $\pi$ -Elektronen im Sinne einer Diensynthese (oder deren Vorstufe, Dispersioneffekt!) einwirken. Für Raumstrukturanalyse gibt es in einem Zweiphasensystem vom Ölkettentypus die verschiedensten Möglichkeiten. Ich erinnere an die Einwirkung der Alkanole und Amine auf die Nitrobenzolkette z. B. (Seite 100) und besonders an die Tatsache, dass auch nonpolare Verbindungen wie Zyklohexan, Dioxan und CCl<sub>4</sub> spezielle Potentialänderungen hervorrufen können.

*Der Bau des Rezeptorensystems vom physikalisch-chemischen Gesichtspunkt aus betrachtet.* Die Frage ist nun, inwieweit es angebracht ist, diese Betrachtungen über elektrische Erscheinungen in Zwischenflächenstrukturen auf das System der Geruchsrezeptoren *in vivo* zu übertragen. Die Ansichten aller Autoren sind darin übereinstimmend, dass die primäre Einwirkung der Riechstoffe sich in gewissen lokalisierten Bezirken der Riechzellen vollzieht (unabhängig davon, wie diese anatomisch zu grösseren Einheiten zusammengesetzt sind). Es scheint kein Zweifel dar-

Die Lokalisation der primären Einwirkung.

über zu bestehen, dass die distalen Enden der Riechzellen — mit den Riechhärchen — die primäre Einwirkungszone darstellen. PARKER (1922 a) schreibt darüber: »These lashes are without doubt the true receptive elements of the olfactory cells. The secretion, in which they are suspended and whose thickness they probably penetrate, is produced by the numerous olfactory or BOWMAN glands, whose ducts open out abundantly through the olfactory epithelium.«

Von rein physikalisch-chemischem Gesichtspunkt aus könnte das System der Riechzellen als ein diphasisches System vom Ölkettentypus betrachtet werden. Die peripheren Enden der Riechzellen mit den Riechhärchen, die offenbar von Lipoidnatur sind ( $\text{OsO}_4$ -Färbung!), stellen die organische Phase dar, die von einer Wasserphase — aus den Bowman'schen Drüsen stammend — umgeben ist. Die zweite Einkoppelungsstelle der organischen Phase ist wahrscheinlich im Grenzflächengebiet zwischen dem basalen Teil der Riechhärchen und dem Zellinneren lokalisiert; das Zellplasma ist also als die zweite Wasserphase anzusehen. Weiter spricht die Beteiligung von Cerebroziden und Phosphatiden im chemischen Bau der nervösen Gewebe im allgemeinen für die Lipoidnatur der Riechhärchen und wahrscheinlich auch für die periphere Begrenzungsfläche der Riechzellen überhaupt.

Die Riechzellen als ein Ölkettensystem betrachtet.

Die Einwirkung der Riechstoffe auf die verschiedenen peripheren Grenzflächen Lipoid-Wasser bedeutet somit einfach eine spezielle Beeinflussung eines — allerdings in spezieller Weise ausgebildeten — Zellmembrans, ein Vorgang, der in unzähligen anderen physiologischen Systemen seine Analogien hat. Die Sonderstellung der Chemozeptorenzellen, die sich im Vermögen, chemische Eingriffe in bioelektrische Störungen zu transformieren, äussert, lässt es als möglich erscheinen, dass der *Primärreiz mit dem Auftreten von speziellen Potentialänderungen im peripheren Zwischenflächenmembran verbunden sein könnte.*

Die erste Voraussetzung für die weitere Entwicklung dieses Gedankens ist jedoch, dass wirklich die Möglichkeiten zur Erzielung definierter phasengrenzelektrischer Erscheinungen bei den für die Rezeptorenreizung in Frage kommenden Riechstoffmengen bestehen. Ein direkter Vergleich der für den Minimalreiz erforderlichen Riechstoffkonzentrationen und der Konzentrationen organischer Stoffe, die für das Entstehen grösserer Potentialdifferenzen in diphasischen Ketten erforderlich sind, wirkt hier zuerst etwas entmutigend. Ein einfacher Überschlag zeigt aber,

dass dieser scheinbare Grössenordnungsunterschied der Konzentrationsverhältnisse nicht allzu überwältigend ist.

*Der adequate Reiz.* Nach den Daten von KOLMER (1928 a) im Abschnitt »Geruchsorgan« im Hdb. der mikroskopischen Anatomie des Menschen kann die totale Anzahl der Riechzellen im Riechepitel grössenordnungsgemäss geschätzt werden. Der mittlere Abstand der Zellen scheint im Durchschnitt etwa  $5 \mu$  zu sein, was  $\left(\frac{1\,000}{5}\right)^2 = 4 \cdot 10^4$  Zellen pro  $\text{mm}^2$  entsprechen würde. Für die

Die Menge  
»wirksamer  
Rezeptoren-  
substanz«.

totale Ausdehnung des Riechepitels kann der klassische Wert  $\approx 2 \cdot 250 \text{ mm}^2$  genommen werden, was eine Totalanzahl von Riechzellen im peripheren Geruchssinn  $= 2 \cdot 250 \cdot 4 \cdot 10^4 = 2 \cdot 10^7$  ergeben würde. Wahrscheinlich liegt der Durchschnittswert zwischen  $10^7$  und  $10^8$ ; der letztere Wert würde einem mittleren Abstand der Zellen von  $\approx 2.5 \mu$  entsprechen. Aus den Angaben von KOLMER (loco cit.) geht weiter hervor, dass die peripheren Enden der Riechzellen, deren Dicke etwa  $1\text{--}2 \mu$  beträgt, zu etwa  $2 \mu$  aus der Oberfläche des Epitels herausragen, was einem Durchschnittsvolumen jeder einzelnen »Kuppel« von etwa  $1.5\text{--}6 \mu^3$  entspricht. Wird hierbei auch noch das kleine Volumen der Riechhärchen in Rechnung gezogen — 5 Härchen, Dicke  $0.5 \mu$ , Länge  $2 \mu = 5 \cdot 0.4 = 2 \mu^3$  —, so gelangt man zu einem Totalvolumen jedes einzelnen peripheren Rezeptorenelementes von  $3.5\text{--}8 \mu^3$ , sagen wir im Durchschnitt  $5 \mu^3$ . Das gesamte Volumen aller dieser Elemente würde somit  $5 \cdot 10^7\text{--}5 \cdot 10^8 \mu^3$  erreichen, d. h. es muss von der Grössenordnung  $\approx 0.1 \text{ mm}^3$  sein. Nehmen wir einfach das spezifische Gewicht der Elemente  $= 1$  an, so ergibt sich die *Totalmenge »wirksamer Rezeptorensbstanz« als etwa 0.1 mg.*

Nach den Angaben von KOLMER (1928 b.), dass die Durchschnittsdicke der »peripheren« Wasserphase etwa  $2 \mu$  beträgt, lässt sich deren Totalvolumen — auf die ganze Ausdehnung des Riechfeldes bezogen — auf  $2 \cdot 250 \cdot 2 \cdot 10^{-3} = \approx 1 \text{ mm}^3$  schätzen.

Als Beispiel einer Substanz, die in extremster Verdünnung noch wahrnehmbar ist, kann das  $\alpha$ -Jonon angeführt werden; ZWAARDEMAKER hat für die Schwellenkonzentration  $10^{-7} \text{ mg/Liter Luft}$ , HENNING  $5 \cdot 10^{-8} \text{ mg/Liter Luft}$  angegeben (COHN, 1924 c). Es ist ziemlich wahrscheinlich, dass bei dieser extremen Verdünnung etwa ein Liter Luft eingeschnüffelt werden muss. Nehmen wir

an, dass von den  $10^{-7} \text{ mg}$  Substanz nur ein Tausendstel an den Rezeptorenbezirk gelangt — eine nicht allzu optimistische Annahme —, so ergibt sich hier in der dünnen Wasserschicht von  $1 \text{ mm}^3$  eine Konzentration von etwa  $10^{-8} \%$ . Wird jetzt diese

Die minimale  
Konzentration  
von Riech-  
stoffen für  
Reizaus-  
lösung.

Substanzmenge von den freien lipoiden Enden der Rezeptorenzellen adsorbiert und infolge der Verteilungsverhältnisse hineingelöst, so ergibt sich in dem — hypothetischen — Fall der vollständigen Lösung in den lipoiden Riechelementen eine Riechstoffkonzentration von der Grössenordnung  $10^{-8}/0.1 = 10^{-7} \%$ . Es ist aber klar, dass in der Zwischenflächenzone ein Konzentrationsgebiet entstehen wird, wo die örtliche Konzentration des Riechstoffes infolge adsorptiver Anreicherung den Wert  $10^{-7} \%$  sicher um 2 Grössenordnungen überschreiten kann. Ich glaube, dass man zu der Behauptung berechtigt ist, dass die *Minimalkonzentration einer Substanz im Zwischenflächengebiet bei eben noch wahrnehmbarer Geruchsempfindung niemals  $\sim 10^{-5} \%$  unterschreitet*.

Diese minimale Substanzkonzentration genügt aber bei gewissen geeigneten diphasischen Ketten sicherlich, um beträchtliche Potentialänderungen in der betroffenen Zwischenfläche hervorzurufen! In dem System  $0.0001\text{-n KCl}|\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}|0.0001\text{-n KCl}$  habe ich gefunden, dass Methylenblauchlorid — der einen KCl-Lösung zugeführt — in der Verdünnung  $10^{-7}$  n, d. h.  $\sim 0.5 \cdot 10^{-5} \%$ , noch ein Asymmetriepotential von 10—15 mV hervorruft, Jod in der entsprechenden Nitrobenzolkette in einer Totalkonzentration von  $10^{-6} \%$  eine Potentialänderung von 5—10 mV. BEUTNER (1941) hat gefunden, dass Acetylcholin in einer Verdünnung von  $10^{-6} \%$  in der Kette  $0.1 \%$  Na-Benzolat /Nitrobenzol/  $0.1 \%$  Na-Benzolat ein Asymmetriepotential von 5 mV bewirkt. Diese winzige Substanzmenge ist — wie BEUTNER hervorhebt — von derselben Grössenordnung wie die in einzelnen motorischen Endplatten für Reizübertragung erforderliche Acetylcholinmenge. (BUCHTHAL und LINHARD 1939). Übrigens kann erwähnt werden, dass Nitrobenzol mit  $10^{-7} \%$  n-Oktylamin einen von reinem Nitrobenzol deutlich abweichenden KCl-effekt aufweist. Die Einwirkungskonzentrationen bei diesen Systemen und die bei dem besprochenen Extremfall der Geruchsrezeptorenreizung sind also in ihren Grössenordnungen nicht allzuweit von einander entfernt.

*Die Aktionsauslösung.* Auf die Frage nach dem Entstehen von Aktionspotentialen bei Reizung sensorischer Endorgane ist noch keine endgültige Antwort gegeben worden. Die verschiedenen Ansichten sind aber darin übereinstimmend, dass der Vorgang dem Alles-oder-Nichtsgesetz unterliegt. Die Tatsache, dass ein überschwelliger Stimulus nicht nur beim Einschalten, sondern auch bei anhaltender Einwirkung eine sensorische Empfindung

hervorzurufen vermag, deutet auf einen peripheren Mechanismus hin, der imstande ist, eine konstante »Deformierung« des betr. Rezeptorenbezirkes in einen rhythmischen Zug von Aktionen zu transformieren. Was den Geruchssinn betrifft, so ist es offenbar, dass die betr. Eindrücke nicht nur durch intermittente Adsorption und Elution der Riechstoffe hervorgerufen werden, besonders, wenn man an die Tatsache erinnert, wie rel. langsam derartige Vorgänge *in vitro* verlaufen. *Auch der konstante chemische Reiz — während einer kürzeren oder längeren Zeitdauer — muss die Rhythmik der Aktionen auslösen können.*

Anorganische  
Modelle für  
die Aktions-  
rhythmik.

Die rhythmisch-elektrischen Vorgänge in gewissen Grenzflächen zwischen Metallen und geeigneten Elektrolyten sind als Modelle für primäre Reizung der sensorischen Endorgane vielfach erwähnt worden. Ich erinnere an das klassische »Nervenmodell« von LILLIE (System  $\text{Fe}—\text{HNO}_3$ ), wo die lokale, konstante Störung eines begrenzten Oberflächengebietes periodische Aktionen auslöst, die sich von der Störungsstelle aus in rhythmischem Zug die Oberfläche entlang verbreiten. Als »Störung« oder »Reiz« benutzt LILLIE (1929) u. a. ein über den Eisendraht gezogenes, ziemlich eng angepasstes Glasrohr, wodurch eine lokale *Diskontinuität* der chemischen Verhältnisse in der Oberfläche hervorgerufen wird. In dem ähnlichen System  $\text{Fe}—\text{H}_2\text{SO}_4—\text{CrO}_3$  (EHRENSVÄRD u. EHRENSVÄRD 1937), habe ich zwecks Erzielung einer lokalen Störungsstelle die Metalloberfläche teilweise mit einer Lack-schicht überzogen. Die rhythmischen aktionsähnlichen Oberflächenpotentiale gehen von der Grenzzone Lack-Metall aus, weil gerade in dieser Zone *lokal* veränderte Konzentrationsverhältnisse der einwirkenden Agenzien vorkommen. ADRIAN (1935 a) schreibt über die Vorgänge bei dem Lillie'schen System:

»The stimulating effect is due simply to the difference of potential between the exposed or active iron at the end of the wire and the passive film beyond it, in fact the active region sets up a train of waves for the same reason that causes the spread of the individual wave from one point to another. The frequency of the waves depends on the rate of recovery of the wire and on the size of the permanently active area; it can be varied therefore by increasing or reducing this area. In the same way persistent activity, or, in terms of the membrane hypothesis, persistent depolarisation in a sensory nerve ending might account for the rhythmic impulse discharge. A partial or complete breakdown of a polarised surface is an event which would be likely to follow mechanical deformation; and if the extent of the breakdown depends on the amount of deformation it would determine the frequency of the rhythmic discharge as in the iron wire model. Temperature change or chemical

change might have the same destructive effect on the surface of the endings which respond to these stimuli, and again the area involved or the degree of depolarisation would depend on the intensity of the stimulus."

Mit dem System  $\text{Fe-H}_2\text{SO}_4\text{-CrO}_3$  habe ich einige einfache Versuche gemacht, die als Modelle einer Aktionsauslösung bei konstanter Einwirkung von Fremdstoffen dienen mögen. Die Frequenz der Aktionen ist von dem Konzentrationsverhältnis  $\text{H}^+/\text{Cr}_2\text{O}_7^{--}$  abhängig und erlischt z. B. bei den Konzentrationen  $0.6\text{-n H}_2\text{SO}_4/0.78\text{-n CrO}_3$ . Das Potential  $\text{Fe}/\text{Au}$  in Lösung ist jetzt konstant auf dem Niveau  $\text{Fe}/\text{FeO}_2^{--}$  (KARSCHULIN, 1937). führt man diesem System anwachsende Mengen von z. B.  $\text{Zn}$ -Ionen zu, so werden bei einer bestimmten »Schwellenkonzentration« Aktionen ausgelöst, deren Frequenz mit steigenden Konzentrationen stetig zunimmt (Vgl. die Tabelle).

Ein Modell der Chemozeptorenbeeinflussung.

System:  $\text{Fe}/0.60\text{-n H}_2\text{SO}_4, 0.78\text{-n CrO}_3$ .

Log c.	Frequenz (in Schwingungen pro Min.) bei Zufuhr von:		
	$\text{NH}_4^+$	$\text{Zn}^{++}$	$\text{Al}^{+++}$
0.2 —2 . . . . .	—	—	—
0.4 —2 . . . . .	—	—	3
0.46 —2 . . . . .	—	—	4
0.54 —2 . . . . .	—	—	5
0.63 —2 . . . . .	—	5	7—8
0.72 —2 . . . . .	—	6	12
0.83 —2 . . . . .	4	9—10	12
0.85 —2 . . . . .	9	15—17	12—13
0.96 —2 . . . . .	12	20—25	12—14
1.06 —2 . . . . .	14—16	35—40	—
1.29 —2 . . . . .			

(Die Konzentration c der zugeführten Ionen bezieht sich auf deren molare Konzentration in der  $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-CrO}_3$ -Lösung. Die zugeführten Lösungen der Metallionen waren in Bezug auf das Verhältnis:  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{CrO}_3$  mit der ursprünglichen Lösung identisch.)

Das Phänomen beruht sicherlich auf einer Verschiebung des Konzentrationsverhältnisses  $\text{H}^+/\text{Cr}_2\text{O}_7^{--}$  im Grenzflächengebiet in der Richtung einer erschwerten Eindiffusion der  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{--}$  Ionen (Vgl. Seite 81). Das System ist also von den einwirkenden Ionen in ein Konzentrationsgebiet eingeführt worden, wo das

Verhältnis  $H^+/Cr_2O_7^{--}$  die Aktionsauslösung ermöglicht. Ohne den realen Wert des Versuches zu überschätzen, möchte ich hier darauf hinweisen, dass das beschriebene Phänomen tatsächlich einer Art »Alles-oder-Nichtsgesetz« gehorcht. ADRIAN (1935 b) schreibt weiter:

»To revert now to the sense organs, we have a reasonable working hypothesis in the notion that the stimulus causes a persistent depolarisation, or surface leakage, of variable extent and that this sets up the intermittent waves of depolarisation which spread down the nerve fibre. But there is another possibility, though it can only be stated in vague terms. It rests on the fact that an electric stimulus appears to act on a nerve fibre by setting up some preliminary change which is not itself a depolarisation. BISHOP (1927) has shown this by recording the potential changes in the region under the stimulating electrodes: an inadequate stimulus, though it increases the excitability of the fibre, causes no potential change and therefore no depolarisation, and a slowly increasing current causes no depolarisation until the moment when the impulse is fired off. This means that the excitability of the fibre, or, to be more concrete, the instability of the surface membrane, can be made to increase up to the point when the surface breaks down although until it does so there has been no change in permeability. Thus the essential change in the sense organ may be not a depolarisation but a development of the condition which leads up to it. There would then be no persistent depolarisation in any part of the ending or fibre but merely the brief waves set up in the region where the surface has become unstable.«

Betrachten wir jetzt das System der Geruchsrezeptoren, so sind hier alle Voraussetzungen dafür gegeben, dass beim Einwirken der Riechstoffe eine lokale Diskontinuität in der Grenzmembran der Sinneszellen entstehen kann. *Diese Diskontinuität ist in der Übergangszone zwischen den von Riechstoffen beladenen freien peripheren Enden der Rezeptorenzellen und dem Rest des Zellmembrans lokalisiert.* In diesen beiden Bezirken muss nämlich ein definierter Unterschied zwischen den Zwischenflächenpotentialen entstehen, was eine elektrische Ausgleichstendenz in der Übergangszone mit sich bringt. *Bei einer bestimmten Höhe dieses »Unterschiedes der betr. lokalen Potentialausbildung« werden irgendwo in der Übergangszone die entstehenden Lokalströme Aktionen auslösen, die, zu dem Zentralnervensystem weitergeleitet, eine Geruchswahrnehmung anmelden.*

Es ist augenscheinlich, dass diese Gedanken nur eine Weiterentwicklung der Theorie der fortschreitenden rhythmischen Polarisation des Nervenmembrans darstellen. Die Ansichten einer Autorität wie SCHAEFER (1940 a) stehen hiermit im Einklang.

Die Lage der  
lokalen Diskontinuität  
in den  
Riechzellen.

»Was liegt näher, als die Vorgänge in Sinnesorganen unter dem Gesichtspunkt lokaler Nervenerrregungen zu betrachten, fanden wir doch auch, dass die elektrischen Reizgesetze für Sinnesorgane und Nerven die gleichen waren. Wir kennen zwar noch nicht lokale elektrische Potentiale, die in den Sinnen entstehen und als adäquater Reiz für die abführende Nervenfasern dienen. Doch verhält sich das Sinnesorgan in allen charakteristischen Punkten so ähnlich dem Nerven und auch dem Zentralnervensystem (in dem ja auch die Impulse durch lokale Potentiale ausgelöst werden), dass an der Einheitlichkeit der Vorgänge nicht zu zweifeln ist. So müssen wir uns also vorstellen, dass schnell reagierende Organe mit schneller Adaptation gleich Nerven mit kleiner Chronaxie und starker Akkommodation sind; dass aber Sinnesorgane mit langer Entladungsdauer, also langsamer Adaptation, den rhythmisch reagierenden Nerven gleichzusetzen sind.<sup>1</sup> Auch funktionell bestehen enge Beziehungen zwischen beiden. Setzen wir Adaptation schlechtweg gleich Akkommodation, so zeigen alle schlecht akkommodierenden und deshalb rhythmischen Organe Funktionen, bei denen die Möglichkeit der Dauererregung vor allem wichtig ist, die Geschwindigkeit der Reaktion hingegen nicht im Vordergrund steht. Der Lichtsinn ist z. B. hier zu nennen. Alle Organe jedoch, die starke Akkommodation zeigen, sind Systeme, bei denen es auf schnellste Reaktion ankommt, wobei aber die Dauererregung unnötig oder gar unerwünscht ist. Systeme der letzten Art sind alle dem animalischen Nervensystem unterstellt, während die rhythmischen Systeme im allgemeinen vegetative Vorgänge beherrschen.«

Wie SCHAEFER betont, kennen wir noch nicht die absolute Grösse der lokalen Potentiale, die den adäquaten Reiz für Sinnesorgane darstellen. Die rhythmische Aktionsauslösung in verletzten Nerven gibt jedoch einen Hinweis darauf. Es ist höchstwahrscheinlich, dass hier die Lokalströme im Verletzungsbezirk die auslösenden Faktoren darstellen. Eine verletzte Nervenzelle besitzt im Verletzungsgebiet eine abgegrenzte depolarisierte Zone, und was als »Aktionen« hinausgesandt wird, ist ja letzten Endes ein fortschreitender Zug lokaler — total oder partiell depolarisierter — Oberflächenbezirke. Die bei den von einem Verletzungsbezirk ausgehenden Aktionen beobachtete Rhythmik zeigt somit eine weitgehende Ähnlichkeit mit den spez. Verhältnissen beim Reiz einer Sinneszelle, was von ADRIAN (1935 c) schon erwähnt worden ist. Übrigens besteht ein gewisser Parallelismus zwischen den peripheren Sinnesorganen und den zentralmotorischen Synapsen (SCHAEFER 1940 b).

Die Grösse der lokalen Potentialunterschiede.

Wir können also die Grössenordnung der Potentialdifferenzen, die den adäquaten Reiz für Sinnesorgane darstellen, grob ab-

<sup>1</sup> Von mir kursiviert.



schätzen, indem wir das Verletzungspotential als obere Grenze annehmen (Vgl. SCHAEFER 1940 c). Nach Messungen von GARTEN an Olfaktoriusfasern des Hechtes (Siehe SCHAEFER 1940 d) beträgt dieses 23 mV. Angenommen, dass die minimale Erregungsspannung etwa die Hälfte dieses Wertes ausmacht, so gelangen wir zu der Grössenordnung 10—20 mV, eine Potentialdifferenz, die in verschiedenen diphasischen Ketten durch das Einwirken winziger Substanzkonzentrationen erreichbar ist. Ich möchte hier auf die Tatsache hinweisen, dass die allermeisten Zwischenflächensysteme organischen Ursprungs beim Einwirken organischer Verbindungen eine ausgesprochene *Negativierung* der betr. Zwischenfläche aufweisen, was hier in Zusammenhang mit der Erregung peripherer Sinneszellen von gewisser Bedeutung sein mag.

Zusammenfassung.

Kurz zusammengefasst: Durch den speziellen anatomischen Bau der Rezeptorenzellen und des Rezeptorensystems sind die Voraussetzungen dafür gegeben, dass beim Einwirken von Riechstoffen ein lokaler Unterschied in der Zwischenflächenpotentialausbildung zwischen den adsorptiv beladenen und unbeladenen Zwischenflächenbezirken entstehen kann. *Die Zone des grössten Potentialunterschiedes der Zwischenflächenbezirke stellt — infolge des Auftretens von Lokalströmen — den Ausgangspunkt der Aktionspotentiale dar. Die durch die Riechstoffe verursachten Potentialänderungen sind den entsprechenden Verhältnissen beim Einwirken organischer Verbindungen in flüssigen Zwischenflächen analog.*

Obwohl dieser Versuch einer Theorie der primären Chemozeptorenbeeinflussung recht schematisch wirkt, glaube ich doch, dass sie die Vorgänge in groben Zügen wiedergibt. Eine direkte experimentelle Durchprüfung würde auf beinahe unüberwindliche Schwierigkeiten stossen und könnte nur in der von HARTLINE (1938) und GRANIT (1939) angegebenen Weise durchgeführt werden. Die z. Z. einzige Möglichkeit, in das Problem einzudringen, ist der Weg der Modellversuche und Analogieschlüsse, eine Arbeitsweise, bei der natürlich grosse Möglichkeiten zu Fehlschlüssen bestehen. Das Übertragen der Vorgänge aus Gebieten der Zwischenflächenpotentiale auf das System der Chemozeptoren ist aber — davon bin ich überzeugt — mehr als ein Gedankenspiel von hypothetischem Wert. Von physikalisch-chemischem Gesichtspunkt aus besitzen beide Gebiete allzuvielen gemeinsame Züge, als dass ein logischer Zusammenhang abgelehnt werden könnte!

Das Auftreten von Alternationserscheinungen und sprunghaften Intensitätsschwankungen in homologen Reihen gewisser Riechstoffe ist z. B. ein Vorgang, für den kein physikalisch-chemisches Analogon gegeben werden kann — mit Ausnahme von entsprechenden Phänomenen in gewissen Grenzflächensystemen. V. BRAUN (1911 und 1912) berichtet über eine ausgesprochene Geruchsähnlichkeit bei Phenyl-n-Butylalkohol und Phenyl-n-Hexylalkohol einerseits, bei Phenyl-n-Amylalkohol und Phenyl-n-Heptylalkohol andererseits. Auch die Geruchsintensität jener Alkohole weist ähnliche Oszillationen auf. (Eine Parallele hierzu auf dem Gebiet der Geschmackstoffe haben STAUDINGER und MÜLLER (1923) beschrieben. Die Piperidide der  $\omega$ -Phenylfettsäuren mit grader  $-\text{CH}_2$ -Anzahl schmecken schärfer als die mit ungrader). Bei dem min. perceptible der homologen prim-n-Alkanole hat BACKMAN (1916—17) ausgeprägte sprunghafte Veränderungen beobachtet, die auch bei homologen Säuren, Estern, Aldehyden und Ketonen auftreten können. Vgl. Tabelle.

*Schwellenkonzentration homologer aliphatischer Riechstoffe.*

(Nach BACKMAN 1917.)

Alkohole	Min.perc.	Säuren	Min.perc.
$\text{CH}_3\text{OH}$ . . . . .	$3,125 \cdot 10^{-8}$ 2,813	$\text{H} \cdot \text{COOH}$ . . . . .	$52 \cdot 10^{-8}$ 45
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ . . . . .	$434 \cdot 10^{-8}$ 380	$\text{CH}_3\text{COOH}$ . . . . .	$8.8 \cdot 10^{-8}$ 8.0
$\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$ . . . . .	$8.8 \cdot 10^{-8}$ 5.0	$\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}$ . . . . .	$0.7 \cdot 10^{-8}$ 0.7
$\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$ . . . . .	$0.45 \cdot 10^{-8}$ 0.8 0.5	$\text{C}_3\text{H}_7\text{COOH}$ . . . . .	$0.028 \cdot 10^{-8}$ 0.028
$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{OH}$ . . . . .	$1.4 \cdot 10^{-8}$ 1.1	$\text{C}_4\text{H}_9\text{COOH}$ . . . . .	$0.020 \cdot 10^{-8}$ 0.020
$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{OH}$ . . . . .	$1.8 \cdot 10^{-8}$ 0.95	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{COOH}$ . . . . .	$0.2 \cdot 10^{-8}$ 0.2
$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{OH}$ . . . . .	$0.2 \cdot 10^{-8}$ 0.1	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{COOH}$ . . . . .	$2.5 \cdot 10^{-8}$ 2.0
$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{OH}$ . . . . .	$0.0068 \cdot 10^{-8}$ 0.0040	$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{COOH}$ . . . . .	$0.0002 \cdot 10^{-8}$ 0.0002
$\text{C}_9\text{H}_{19}\text{OH}$ . . . . .		$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{COOH}$ . . . . .	$0.002 \cdot 10^{-8}$ 0.001
$\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{OH}$ . . . . .	$0.11 \cdot 10^{-8}$ 0.06	$\text{C}_9\text{H}_{19}\text{COOH}$ . . . . .	$0.045 \cdot 10^{-8}$ 0.058

Die angeführten Konzentrationen beziehen sich auf Anzahl Grammole/Liter Luft.

Eine Diskontinuität der Flüchtigkeit oder Lipoidlöslichkeit ist hier, wie HENNING (1922 b) betont, sicherlich ausgeschlossen. Die Erscheinungen sind sicherlich entsprechenden Phänomenen in Zwischenflächensystemen analog. Ohne einen direkten »Vergleich« zu ziehen, möchte ich hier auf die Einwirkung von n-prim.-Alkoholen auf die Salizylaldehydkette hinweisen (Figur 19, Seite 86).

### Diskussion über Reizintensität und Reizqualität.

Während die Einwirkungsintensität der Riechstoffe unzweifelhaft in der Aktionsfrequenz als solcher ihren Ausdruck findet, müssen wir bei der Frage der Reizqualität von ganz anderen Voraussetzungen ausgehen. Die einzige Feststellung, die hierüber primär gemacht werden kann, ist die, *dass es für eine mentale Beurteilung der Reizqualität unbedingt erforderlich ist, dass diese im Aktionsstrombild des den Rezeptoren angeschlossenen Reizleitungssystems enthalten ist*. Aber wie?. Die beiden einzigen Versuche, die gemacht worden sind, um das Problem experimentell anzugreifen, geben hierüber nur geringe Aufschlüsse. HASAMA (1934) hat bei Kaninchen die durch verschiedene Geruchsreize bewirkten Potentialänderungen von Bulbus Olfactorius bis zu Gyrus Hippocampus verfolgt. Ein Zusammenhang zwischen diesen rel. langsamen Potentialvariationen und der Reizqualität hat sich dabei nicht ergeben. Was bei dem Versuch festgestellt werden kann ist vielmehr, dass die vom Geruchssinn ausgesandten Impulse wirklich längs den anatomisch wahrscheinlichsten Bahnen zu verlaufen scheinen und dass an der angenommenen Zentralstelle, die als »Geruchszentrum« bezeichnet worden ist, die grössten Amplituden der Potentialvariationen registriert werden können. Die Beobachtung, dass periphere Strychninsensibilisierung die Reizschwelle herabsetzt, findet bei anderen Sinnesorganen ihre Analoga. ADRIAN und LUDWIG (1938) haben mit Fischen gearbeitet und im Gegensatz zu HASAMA in dem ziemlich langen Tractus Olfactorius bei peripherer Einwirkung organischer Stoffe einen definierten Zug von Aktionen gefunden. Ein Zusammenhang zwischen dem Aktionsstrombild und der Reizqualität ist auch hier nicht gefunden worden, mit Ausnahme einer Beobachtung, auf deren Bedeutung ich zurückkommen werde. Der Hauptwert dieser überaus interessanten Untersuchung liegt in der Bestätigung, dass die Aktionsausbildung beim Rezeptorenreiz dem Alles-oder-Nichts-gesetz zu gehorchen scheint, obwohl im peripheren System beson-

Die experi-  
mentelle  
Unterlage.

dere Verhältnisse zu herrschen scheinen. So ist z. B. im nicht gereizten Zustand eine Aktionsrhythmik im Traetus beobachtet worden, deren peripherer Ursprung ziemlich wahrscheinlich ist, weil sie durch Rezeptorenreiz ausgelöscht wird und durch einen Zug von Aktionen grösserer Amplitude ersetzt wird. Die Frequenz der Aktionen nimmt bei gesteigerter Reizkonzentration bis zu einer gewissen Grenze stetig zu.

Man könnte sich fragen, wie die in vorigen Abschnitten gemachten Überlegungen über die geruchliche Klassifikation organischer Verbindungen mit diesem dürftigen neurologischen Tatsachenmaterial in Einklang gebracht werden können. Ergeben sich aus jenen Besprechungen über gruppenreaktive Wirkungen,  $\pi$ -Elektronenverteilungen und Raumstrukturfaktoren irgend welche Anhaltspunkte für die Übertragung der *Reizqualität*?

Man muss sich hier zuerst darüber klar sein, in welchem Verhältnis die »Qualität« der primären Beeinflussung des Chemozeptorensystems zu der *Qualität der Empfindung* steht. Wie schon im Abschnitt II (Seite 18) betont worden ist, muss die Annahme, dass zwei qualitativ ähnlich riechende Verbindungen von analoger innerer Struktur »in gleichartiger Weise« in das Rezeptorensystem eingreifen, als berechtigt erscheinen. Dieser Begriff »in gleichartiger Weise« kann aber nicht einfach mit einer Zwischenflächenpotentialänderung in auf gewisse Riechstoffe spezifisch eingestellten Rezeptoren in Zusammenhang gebracht werden. Die Annahme einer, den verschiedenen Geruchstypen entsprechenden Anzahl von Rezeptorelementen würde zwar eine einfache — aber auch sehr unwahrscheinliche Lösung des Problems darstellen, besonders, wenn man die dazu erforderliche Anzahl von Rezeptortypen in Betracht zieht. Ich persönlich kann mir auch schwer vorstellen, wie rein entwicklungsphysiologisch eine derartige reaktive oder Verankerungs-Spezifität zustande kommen könnte. Zu Schwierigkeiten ganz anderer Art gelangt man bei Annahme eines Systems analog gebauter »polyvalenter« Rezeptorelemente. Es stehen hier die Vorgänge bei der Intensitätsübertragung im Wege. Wenn auch die Schwellenwerte der Reizauslösung für alle Riechstoffe verschieden sind, so würde doch bei einer gewissen Höhe der (konzentrationsabhängigen!) Potentialdifferenz eine Aktionsfrequenz ausgelöst werden, was eine bestimmte *Reizintensität* registrieren würde, über die *Reizqualität* aber nichts auszusagen vermag. Durch Untersuchungen über andere Sinnesorgane sind jedoch während der letzten Jahre ge-

Die Frage von der Anzahl verschiedener Rezeptorelemente.

wisse Befunde gemacht worden, die immerhin die Lösung des Problems der peripheren Reizqualität auf Basis der Annahme einer sehr begrenzten Anzahl von Rezeptorentypen andeuten. Bei weiterer Entwicklung dieser Gedanken lässt sich schliesslich unter zwei physiologisch ziemlich berechtigten Annahmen ein System skizzieren, das die Möglichkeit einer Art »qualitativer Analyse« einschliesst. Diese Annahmen sind die, dass im Rezeptorensystem unter den einzelnen Rezeptorelementen eine bestimmte Verteilung

- 1.) der primären Reizschwellen,
- 2.) der Adaptation

eingehalten wird. Wir nehmen dabei zunächst an, dass der Bau der Zwischenflächenstruktur der Adsorptionsbezirke chemisch und physikalisch für alle Rezeptorelemente durchweg analog ist.

Die chemische Beeinflussung eines derartigen Systems bedeutet primär das sukzessive »Einschalten« einer Anzahl von Rezeptorelementen. Diese Anzahl wird in jedem Zeitabschnitt des Reizvorganges durch die Grösse der von dem betr. Riechstoff bewirkten Zwischenflächenpotentialänderungen bestimmt, die ihrerseits von der Einwirkungskonzentration *und* der Adsorptionsgeschwindigkeit abhängig sind. Dies bedeutet, dass in jeder »Reizzone« einer Riechzelle beim Erreichen eines für die betr. Zelle charakteristischen Potentialunterschiedes zwischen den »beladenen« und »unbeladenen« Zwischenflächengebieten eine Folge von Aktionen ausgelöst wird, deren Frequenz in den nächsten Zeitabschnitten

- 1) vom Anstieg der Potentialdifferenz,
- 2) von der Adaptation

bestimmt wird:

Hier lässt sich eine erste Differenzierung der Reizwirkung verschiedener Riechstoffe durchführen. Nehmen wir an, dass zwei Riechstoffe dieselbe schwellige Potentialdifferenz im Reizbezirk einer Rezeptorenzelle bewirkt haben, so wird dadurch die Gleichwertigkeit der Reizeingriffe nicht eindeutig bestimmt. *Wenn auch in beiden Fällen derselbe Potentialgradient in der Reizzone erreicht wird, so besteht hier keine Notwendigkeit dafür, dass die beiden Übergangszonen als Aktionsauslösungsstelle analog funktionieren.* Die Frequenz der Aktionen in den nächsten Zeitabschnitten nach erreichtem Reizeinbruch steht doch letzten Endes mit dem im Zusammenhang, was wir schlechtweg als Depolarisationsmöglichkeiten der Reizzone bezeichnen können. In Bezug auf eine der-

artige »lokale Oberflächenentladung« können sich zwei Stoffe gänzlich verschieden verhalten, unabhängig davon, ob sie — bei einem gewissen Konzentrationsverhältnis — denselben Potentialbeitrag liefern können. Rein modellgemäss ist es doch ersichtlich, dass eine Potentialänderung von z. B. 20 mV in der Zwischenfläche Nitrobenzol/Wasser, durch Oktylamin bzw. Hexylalkohol verursacht, zwei durchaus verschiedene Änderungen der Energetik der Zwischenflächenstruktur entsprechen. Es ist also zu erwarten, dass die »absoluten« Schwellenwerte der einzelnen adsorptiv beladenen Rezeptorelemente von der Struktur und Einlagerungsweise der einwirkenden Stoffe in verschiedenen Richtungen beeinflusst werden können. Zieht man weiter in Betracht, dass die verschiedenen Restitutionsvorgänge in der Reizzone der einzelnen Elemente höchstwahrscheinlich von denselben Faktoren abhängig sind, so leuchtet es ein, dass sich hier die verschiedensten Strukturfaktoren der einwirkenden Stoffe qualitativ differenzieren lassen.

Man könnte es so formulieren: Bei der adsorptiven Beladung der Rezeptorelemente mit irgend einer Verbindung werden die dadurch bewirkten lokalen Zwischenflächenpotentialdifferenzen bei einer für jedes Rezeptorelement charakteristischen Schwellenhöhe eine Folge von Aktionen auslösen, deren Frequenzbild, vom Reizeinbruch ab gerechnet, durch die Abhängigkeit der Adaptationsvorgänge mit dem speziellen Typus der adsorptiven Einlagerung bestimmt wird. Die cerebrale Beurteilung der Verhältnisse zwischen den einzelnen Aktionsfolgen (Summationsvorgänge) bildet die Basis für die *Qualität* des entstehenden Geruchseindrucks. Die *Intensität* des Eingriffes steht mit der Anzahl eingeschalteter Rezeptorelemente in engem Zusammenhang und findet in der Totalfrequenz im Reizleitungssystem ihren Ausdruck.

Dieses flüchtig skizzierte System ist eigentlich nur ein Weiterverfolgen der Gedanken von ZOTTERMAN (1938), wie er sie in seiner Arbeit über verschiedene Beeinflussungen der Tastrezeptoren entwickelt hat. Jene Untersuchungen weisen eindeutig darauf hin, dass ein gewisser Reiztypus eine Anzahl von Rezeptoren bestimmter Art einschaltet, was zu einer speziellen Verteilung der reizansprechenden Elemente führt. Über die Grösse der Adaptationsunterschiede der Geruchsrezeptoren lassen sich z. Z. noch keine Aussagen machen. Die Befunde von ADRIAN und LUDWIG (1938) dass — wenigstens bei Fischen — gewisse Stoffe

langdauernde Aktionsfolgen beim Konzentrationsanstieg, andere bei Elution (Anis!) aufweisen, deuten auf das Vorhandensein mehrerer Rezeptoren mit verschiedenen Hemmungserscheinungen hin. Dafür spricht auch der Befund, dass im Ruhezustand fortwährend eine Aktionsfolge ziemlich langsamer Frequenz ausgelöst wird. Das System erinnert an die Befunde von HARTLINE (1938), die für das Vorhandensein von wenigstens drei definierten Rezeptorentypen im Auge des Frosches sprechen, die alle in verschiedener Weise auf denselben Lichtreiz reagieren.

Was an obiger Ausführung bedenklich erscheinen mag ist natürlich die Annahme, dass das Verhältnis zwischen den betr. Aktionsfolgen den integrierenden Teil der Qualitätsbeurteilung darstellen soll. Ich möchte aber betonen, dass das Wort »Verhältnis« hier nicht buchstäblich genommen werden darf. Der Ausdruck deutet vielmehr spezielle Beziehungen der Aktionsfolgen in qualitativer Weise an. Überhaupt scheint die Annahme berechtigt zu sein, dass bei jedem Sinnesorgan die Reizqualität in irgend einem Zusammenhang mit bestimmten Beziehungen zwischen den einzelnen Aktionsfolgen steht. ADRIAN (1935 d) hat übrigens in einer Besprechung über die Reizempfindung beim Tastsinn auf die Tatsache hingewiesen, dass ein künstlicher intermittenter Reiz, der eine *Synchronisierung* der Aktionen in verschiedenen Reizleitungen zur Folge haben würde, in einer Empfindung ganz anderer Qualität als der beim natürlichen Reiz (leichtem Berühren z. B.) resultiert. Vgl. ADRIAN (1938).

Es ist klar, dass das skizzierte Chemozeptorensystem sehr geringe Möglichkeiten für ein direktes Angreifen der Frage vom Zusammenhang zwischen der Struktur der Riechstoffe und der Riechqualität bietet. Die Art und die Wege, auf denen der Molekülbau der einwirkenden Verbindungen als Empfindungsqualität zum Ausdruck kommt, sind in der *Kombination* der reagierenden Sinneszellen enthalten, wodurch jede *direkte* Beziehung zwischen Struktur und Sinneseindruck ausgeschlossen wird. Das, was sich aus obiger Betrachtungsweise ergibt, sind vielmehr die Beziehungen zwischen den primären Einwirkungsweisen der verschiedenen Riechstoffe und deren Molekülstruktur. Dementsprechend ist bei analog gebauten Verbindungen, wie prim.-n-Alkoholen, bei denen man eine ziemlich analoge adsorptive Eünlagerung annehmen kann, eine Geruchsqualität zu erwarten, die bei anwachsender Anzahl von Kohlenstoffatomen in der Kette nur langsam verändert würde. Phenole dagegen würden infolge ihrer

Die Beziehungen zwischen Geruchsqualität und Molekülbau der Riechstoffe.

ausgesprochenen Protonenbeweglichkeit am —OH ein abweichendes Verhalten aufweisen. Es ist dabei nicht ausgeschlossen, dass die charakteristischen Gerüche von Verbindungen mit an Aromatenstrukturen direkt angeschlossenen Gruppen auch mit einer ganz speziellen Einlagerungsweise an den Rezeptorelementen verbunden sein könnten. Die spezielle Wirkung gewisser Aromaten auf bestimmte Zwischenflächensysteme (Seite 98—99, Fig. 27, 28) könnte hier als Parallele herangezogen werden. Es ist weiter zu erwarten, dass der Reiz von Verbindungen mit ausgesprochenen Voraussetzungen für eine »chemische« Verankerung länger anhalten wird als der, der von gesättigten Kohlenwasserstoffen u. a. verursacht wird. Die extrem andauernden Reizempfindungen beim Einwirken von Acylhalogeniden und ähnlichen Stoffen — eine Erscheinung, die z. T. auf irreversible Vorgänge zurückzuführen ist — sprechen für die Berechtigung dieser Auffassung. In diesem Zusammenhang ist nochmals die gleichartige Geruchsqualität flüchtiger Oxydantia einerseits, Reduktantia andererseits, die auf eine reaktive Beeinflussung eines Redoxsystems hindeutet, zu erwähnen. Ob dieses in den peripheren Lipoidbezirken belegen ist oder dem Stoffwechselsystem der Rezeptorenzellen zugehörig ist lässt sich natürlich nicht beurteilen.

Die Erscheinungen der Ermüdung und des Geruchswechsels lassen sich mit dem skizzierten System vereinbaren. Ohne Zweifel sind die ersteren auf dieselben Prinzipien wie die Ermüdungserscheinungen bei anderen Sinneszellsystemen zurückzuführen. Eine langdauernde Einwirkung grösserer Riechstoffmengen, wodurch die Voraussetzungen für ein »peripheres Gleichgewicht« erfüllt werden können, muss auf die Anzahl der eingesandten Aktionsfolgen rückwirken. Der oft zu beobachtende Geruchswechsel, bei Indol z. B. (verdünnt blumig, — konzentriert fäkalähnlich) könnte auf eine vollständige oder partielle Blockierung der Aktionsauslösung in gewissen Rezeptorelementen hindeuten. Für die Deutung der speziellen Erscheinungen, die bei der Einwirkung von Mischungen von Riechstoffen auftreten, lassen sich gewisse Vorschläge machen. Es mag darauf hingewiesen werden, dass bei Einwirkung zweier Stoffe auf gewisse Zwischenflächensysteme bei bestimmtem Konzentrationsverhältnis ein gegenseitiges Auslöschen der Potentialänderungen erfolgen kann. Die Möglichkeit des Herausriechens eines bestimmten Komponenten aus einer Mischung deutet jedoch darauf hin, dass in gewissen



Fällen die Einwirkung der einzelnen Riechstoffe einer Mischung getrennt geschieht. Wie sich ein derartiger Vorgang vollzieht ist schwer zu sagen. Man könnte hier vielleicht sukzessive Adsorptionsverdrängungen in Betracht ziehen, also Vorgänge, die in der chromatographischen Analyse und in gleichartigen Phänomenen ihre Analoga hat.

Es liegt in der Natur der Sache, dass in diesem Versuch, eine einheitliche physikalisch-chemische Deutung des Rezeptionsvorganges zu geben, vielfach Schlussfolgerungen gezogen worden sind, die sich bei einer späteren Durchprüfung als nicht stichhaltig erweisen werden. Besonders gilt dies für die Diskussion über Reizintensität und Reizqualität. Doch lassen sich sicherlich die Überlegungen über die Bedeutung der Zwischenflächenpotentiale auf das Verhalten anderer Chemozeptorensysteme übertragen. Es ist doch recht wahrscheinlich, dass die Beeinflussung der Geruchsrezeptoren und die Reizung der Rezeptoren des Geschmacksinnes und der des *Sinus Caroticus* z. B. prinzipiell gleichartig sind. Was den Geruchssinn betrifft, so können wir z. Z. nicht ohne direktes experimentelles Eingreifen über die skizzierte Darstellung hinauskommen. Wahrscheinlich muss diese künftige Klarlegung auf Basis simultaner Registrierungen der Potentialgradienten und Aktionsfolgen bei einer grösseren Anzahl einzelner Rezeptorenelemente durchgeführt werden, eine überaus schwierige Aufgabe, zu der eine Registrierungsanordnung vom Typus der photoelektrischen Bildübertragung erforderlich sein würde. Erst eine derartig verfeinerte Versuchsmethodik, zusammen mit einer chemischen Untersuchung des Zwischenflächenbaues der einzelnen Rezeptorenelemente hat Aussichten, die Vorgänge bei der Reizung des Geruchsinns und überhaupt bei der chemischen Beeinflussung anderer komplexer Chemozeptorensysteme endgültig zu erhellen.

---

## VI.

### Zusammenfassung.

1. Die Prinzipien der chemischen Beeinflussung physiologischer Systeme sind ganz allgemein besprochen worden.

2. Die Berechtigung, die Wirkung der Riech- und Geschmacksstoffe als einen Spezialfall chemischer Beeinflussung physiologischer Systeme anzusehen, wird kurz diskutiert.

3. Um eine allgemeine Übersicht über das Problem: Molekularstruktur und physiologische Wirkung vorzubereiten, wurde über die Theorien der inneren Struktur organischer Verbindungen eine kurze Zusammenfassung gemacht.

4. Die Möglichkeiten zum Austausch von Ringstrukturen und verschiedenen Atomgruppen in organischen Verbindungen unter Beibehaltung deren spez. physiologischen Wirkungen werden nach allgemeinen Gesichtspunkten behandelt.

5. Die Bedeutung von reaktiven Gruppen und von Raumstrukturfaktoren für die Einwirkung organischer Verbindungen auf physiologische Systeme wird, unter besonderer Berücksichtigung des Verhaltens der Riechstoffe, analysiert.

6. Die Voraussetzungen für eine Analyse der räumlichen Verhältnisse der Kohlenwasserstoffstrukturen in organischen Verbindungen, besonders in Bezug auf die Möglichkeit zu spezifischer Adsorption an flüssigen Zwischenflächen, sind besprochen worden.

7. Struktur und elektrische Verhältnisse in flüssigen Zwischenflächen werden kurz behandelt. Eine Übersicht über die verschiedenen Auffassungen des Entstehens von Zwischenflächenpotentialen in diphasischen Systemen ist gegeben worden.

8. Eine experimentelle Untersuchung über den Einfluss der Struktur einiger organischen Verbindungen auf die Potentialdifferenzen der diphasischen Ketten vom Typus: 1-n KCl/org. Flüssigkeit/x-n KCl ist gemacht worden. Die Bedeutung der Polarisiertheit und der Polarisierbarkeit der Seitengruppen in

monosubstituierten Benzolderivaten für die gemessenen Kettenpotentiale ist besonders untersucht worden.

9. Der Einfluss gewisser organischen Verbindungen auf eine der organischen Phasen der symmetrischen Ketten: 0.0001-n KCl/org. Flüssigkeit/ges. KCl/org.Flüssigkeit/0.0001-n KCl in Bezug auf Kettenpotentialänderungen ist untersucht worden. In gewissen Fällen treten beim Einwirken homologer Verbindungen spezifische Effekte auf. Untersucht sind aliphatische und arylaliphatische prim.n-Alkohole, sek. Alkohole offener oder zyklischer Struktur, einige Ketone, Aldehyde, Amine und Kohlenwasserstoffe.

10. Die Möglichkeiten, dass die elektrischen Erscheinungen in diphasischen Ketten beim Einwirken organischer Verbindungen auf gewisse Zwischenflächenstrukturen im System der Geruchsrezeptoren ihre Analoga haben, werden eingehend diskutiert. Eine Einteilung der Riechstoffe, besonders hinsichtlich der Bedeutung reaktiver Gruppen und Raumstrukturfaktoren ist gemacht worden. Es wird darauf hingewiesen, dass die peripheren Enden der Riechzellen als eine diphasische Kette angesehen werden können.

11. Es ist ein Versuch gemacht worden, eine Theorie der primären Beeinflussung der Geruchsrezeptoren auf Basis zwischenflächenelektrischer Erscheinungen zu schaffen. Es wird dabei u. a. darauf hingewiesen, dass die Einwirkungskonzentrationen der Riechstoffe in extremen Verdünnungen für das Entstehen beträchtlicher Potentialdifferenzen in geeigneten Zwischenflächensystemen hinreichend sind. Die Möglichkeiten, dass in den peripheren Bezirken der Rezeptorenzellen die von Riechstoffen bewirkten lokalen Zwischenflächenpotentialänderungen den adequate Reiz darstellen, werden diskutiert.

12. Aus den Verhältnissen bei anderen Sinneszellsystemen werden in Bezug auf die Prinzipien der Übertragung der Reizintensität und Reizqualität einige Schlüsse gezogen. Zu der Frage der dazu erforderlichen Anzahl verschiedenartiger Rezeptorenzellen wird Stellung genommen.

---

## VII.

### Appendix.

#### Einzelheiten der Methodik.

Die grosse Empfindlichkeit der untersuchten Zwischenflächensysteme für winzige Mengen Fremdsubstanzen machte eine saubere Arbeit durchaus erforderlich. Alle Glasgeräte wurden deshalb stundenlang mit heisser Chromsäure-Schwefelsäure behandelt, danach mit destilliertem Wasser gründlich gewaschen und im Heizschrank getrocknet. Für das Schmieren der Hähne wurde jede Art von Hahn Fett gänzlich vermieden. Um ein Feststecken der mit konzentrierter KCl-Lösung in Kontakt stehenden Hähne zu verhindern, hat sich ein leichtes Anreiben der betr. Hahnkücken mit reinem Graphit gut bewährt, wodurch übrigens eine gute elektrische Leitung durch den geschlossenen Hahn ermöglicht wird.

Als Isolierung der einen Kalomelelektrode wurde ein Block von reinstem Paraffin gebraucht, in dem ein der Elektrode eingepasster Normalschliff festgegossen war. Dies machte auch ein leichtes Auswechseln verschiedener Elektroden möglich. Die Gegenelektrode war in analoger Weise auf einem dicken Ebonitstab montiert.

Zum Messen von KCl-Effekten füllte man die zu benutzenden KCl-Lösungen in hochmontierte 1-Liter-Scheidetrichter ein. Jede Lösung konnte mittels dünner Schläuche und Normalschliffe dem — ebenfalls mit Normalschliff versehenen — Einfüllrohr angeschlossen werden. Das Absaugen der Lösungen, bzw. Konstanthalten des Flüssigkeitsniveaus im Messgefäß wurde durch eine Wasserstrahlpumpe bewirkt. Bei jeder Messung wurde natürlich die Verbindung der Messanordnung zu dem betr. Vorratsgefäß für KCl-Lösung abgebrochen. Gewöhnlich genügte 3—5-maliges Absaugen bzw. Einfüllen einer KCl-Lösung, um eine ziemlich konstante Potentialdifferenz der Kette zu erhalten.

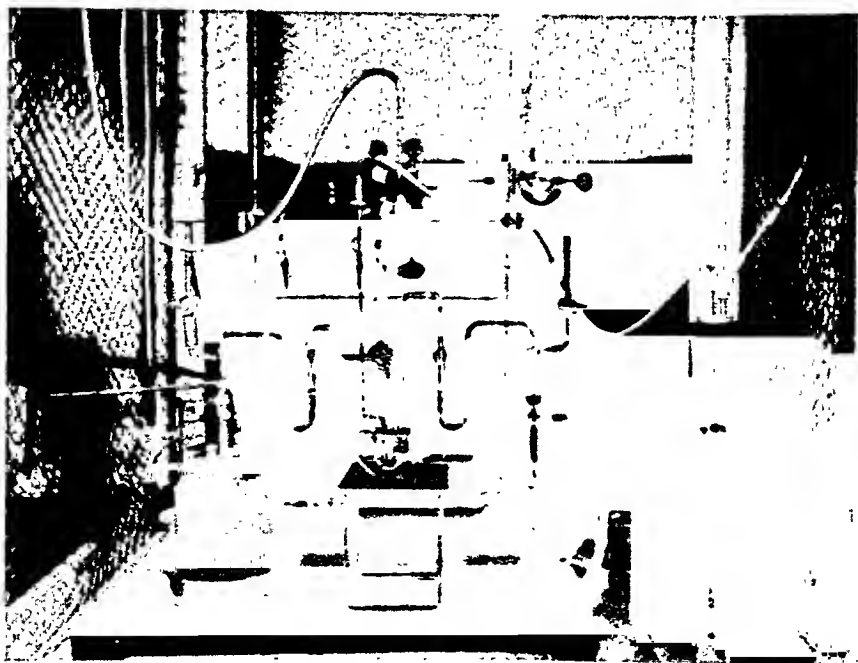
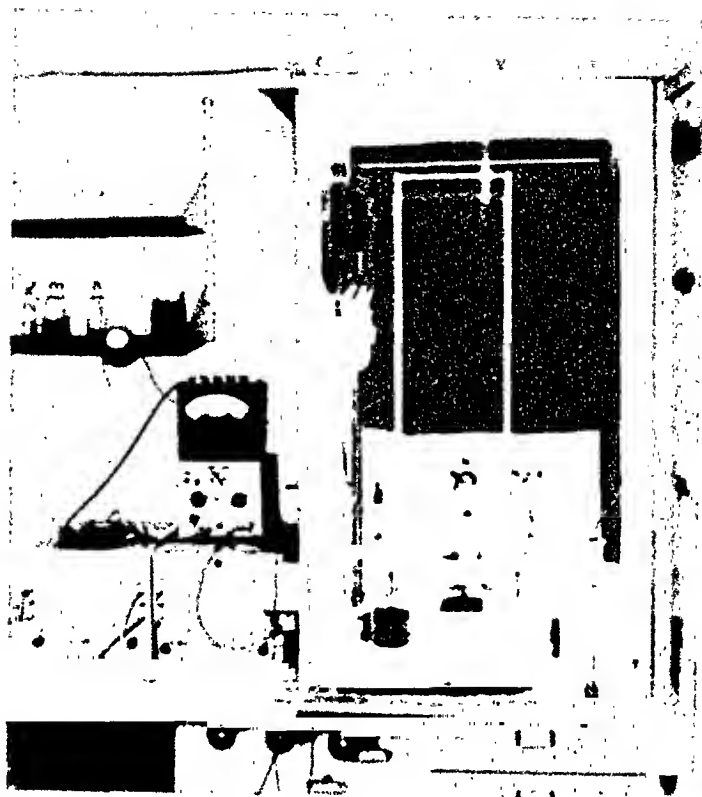


Fig. 33. Die Messanordnung, zur Messung von KCl-Effekt aufgestellt.  
Links Verstärker, Kompensationspotentiometer und Galvanometer.

Beim Messen des Einflusses organischer Verbindungen mittels der Anordnung Seite 85 war strengstens darauf zu achten, dass die Zufuhr des Fremdstoffes aus der Bürette sehr langsam geschah, (circa 0.05 cc pro Min). Bei jeder Messung wurde die Bürette aus dem Messgefäß hochgezogen.

Die Temperatur bei den Messungen betrug gewöhnlich 16°—18°. Aus leicht ersichtlichen Gründen hat sich ein Konstanthalten der Temperatur des Arbeitszimmers schwer durchführen lassen. Doch muss betont werden, dass der Temperaturkoeffizient der Kettenpotentiale ziemlich gering ist, so dass der Einfluss von Temperaturschwankungen bei den Messungen von untergeordneter Bedeutung ist.

Die ganze Messanordnung zusammen mit den Vorratslösungen war in einem geerdeten Drahtnetz Käfig aufgestellt. Messgefäß, Einfüllrohr, bzw. Bürette und Umrührer waren mittels gewöhnlicher Laborklammern an einem Stativ aus groben Ebonitstäben montiert. Trotz der Erdung des Käfigs machten sich, besonders an trockenen Tagen, beim Messen von Systemen mit schlecht leitenden Ölen (wie Chlorbenzol) allerlei elektrostatische Einflüsse, wahrscheinlich Aufladungserscheinungen, störend bemerkbar. Meist gingen jedoch diese Störungen schnell vorüber. Fig. 33 gibt ein Bild der Messanordnung (für Messung von KCl-Effekten aufgestellt).

Der Verstärker war nach dem Gegentaktprinzip aufgebaut,

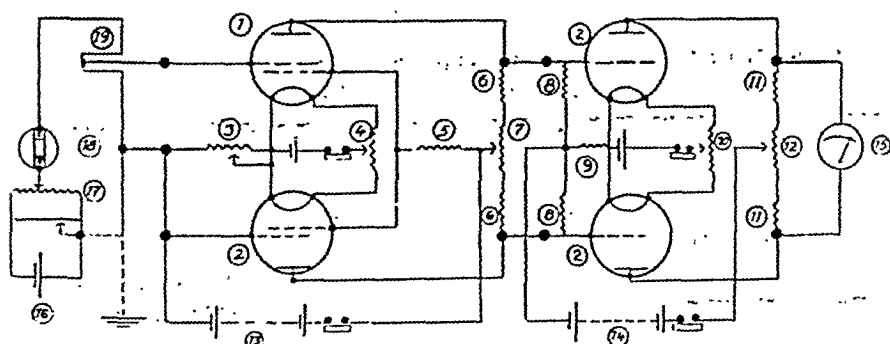


Fig. 34. Schaltung des Verstärkers:

1 und 2:	Telefunken T 113 resp. RE 034.	9:	Widerstand 0.5 M $\Omega$ .
4 und 10:	Potentiometer 10 $\Omega$ .	8:	" 2.0 M $\Omega$ .
3 und 7:	" 1000 $\Omega$ .	16:	Trockenbatterie 1.5 V.
12:	" 10000 $\Omega$ .	13:	" 20 V.
17:	" 250000 $\Omega$ .	14:	" 120 V.
5:	Widerstand 3000 $\Omega$ .	15:	Galvanometer.
6:	" 40000 $\Omega$ .	19:	Umkoppler.
11:	" 0.1 M $\Omega$ .	18:	Ölzelle.

Zur Heizung der Röhre dienten 4 Volt Akkumulatoren.

Siehe Fig. 34. Als Elektrometerröhre haben sich Telefunken T 113 gut bewährt. Um Kriechströme auf der Glasoberfläche der Röhren zu verhindern, wurde diese in einem speziellen Aluminiumkasten, in dem sich ein Gefäß mit  $P_2O_5$  befand, montiert. Der Umkoppler, 19, der zur Erdung des der Messanordnung angeschlossenen Gitters diente, war hochisolierend auf Trolitul montiert. Durch Silberkontakte wurden grössere Kontaktpotentiale vermieden. Der Galvanometer war ein Norma-Instrument mit einer Empfindlichkeit von  $1.6 \mu A$  pro Skalenteil. Die Potentiometeranordnung wurde gegen ein Cambridgeinstrument kalibriert.

Es werden hier zwei Typenbeispiele von Messungen wiedergegeben:

### 1. System: 1-n KCl/Anilin/x-n KCl.

$c_{KCl} = x$	Asymmetriepotential E. (in mV.)								
	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4		Mittelwert
	Unkorr.	Korr.	Unkorr.	Korr.	Unkorr.	Korr.	Unkorr.	Korr.	Korr.
0.00001-n	-126	-118	-113	-110	-116	-116	-120	-113	-114
0.0001-n	-115	-107	-106	-103	-110	-110	-115	-108	-115
0.001-n	-104	-96	-93	-90	-87	-87	-97	-90	-91
0.01-n	-66	-58	-60	-57	-56	-56	-61	-54	-56
0.1-n	-32	-24	-26	-23	-21	-24	-31	-24	-24
1.0-n	-8	$\pm 0$	-3	$\pm 0$	$\pm 0$	$\pm 0$	-7	$\pm 0$	$\pm 0$

### 2. System: 0.0001-n KCl/Salicylaldehyd/Ges. KCl/Salicylaldehyd + Hexanol/1 0.0001-n/KCl.

In 5 cc Salicylaldehyd cintitriertes Hexanol (in cc)	Asymmetriepotential E (in mV)						
	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Mittelwert
	Unkorr.	Korr.	Unkorr.	Korr.	Unkorr.	Korr.	Korr.
0.....	-13	$\pm 0$	-3	$\pm 0$	-14	$\pm 0$	$\pm 0$
0.05 .....	-22	-9	-13	-10	-20	-6	-8
0.1 .....	-26	-13	-20	-17	-20	-6	-12
0.2 .....	-33	-20	-28	-25	-27	-13	-19
0.5 .....	-44	-31	-41	-38	-49	-35	-34
1.0 .....	-53	-40	-50	-47	-60	-46	-43
1.5 .....	-56	-43	-57	-54	-67	-53	-50
2.0 .....	-60	-47	-58	-55	-67	-53	-53

## Synthese einiger organischen Verbindungen.

Die bei den Messungen gebrauchten organischen Verbindungen wurden teils durch Umfraktionieren von Handelspräparaten dargestellt, teils synthetisiert. Das Umfraktionieren geschah in einer Kolonnenanordnung, die gänzlich aus Glas aufgebaut war.

Es muss bemerkt werden, dass in manchen Fällen die Siedepunkte der Handelspräparate beträchtlich von den Literaturangaben abwichen. Bei Heptylalkohol z. B. war oft der Siedepunkt bei 165°—167° beobachtet worden. Der in der Literatur angegebene Wert ist 175°—176°. Jenes Verhalten beruht in diesem Falle wahrscheinlich darauf, dass das Heptanol durch Reduktion von methylhexylketonhaltigem Heptanal (aus Ricinusöl) dargestellt war, was eine Beimengung von Oktanol-2 zur Folge hat. Dies machte sich übrigens durch die erniedrigten Potentialwerte bei der Einwirkung jener Heptanolpräparate auf Salicylaldehyd bemerkbar.

Die meisten sek. Alkohole wurden in gewöhnlicher Weise durch Grignardsynthesen dargestellt. Die zu gebrauchenden Aldehyde wurden durch eine Modifikation des Verfahrens von BOUVEAULT (1894) dargestellt. Um eine Oxydation der Aldehyde zu verhindern, wurde dabei ein kräftiger CO<sub>2</sub>-Strom durch die Reaktionsmischung geblasen.

Einige Amine wurden aus den entsprechenden Nitrilen durch Reduktion mit Na + Alkohol dargestellt. Oktylamin (Sp. 178°) wurde auf dem Wege: n-Hexylalkohol, n-Hexyljodid, n-Hexylmalonester, n-Hexylmalonsäure, Caprylsäure, Caproylechlorid, Caproylamid, Caproynitril, Oktylamin synthetisiert. n-Dekylamin (Sp. 216°) wurde aus Caprinsäure in entsprechender Weise dargestellt. Die übrigen Amine waren umfraktionierte Handelspräparate.

Die o-, m- und p-Phenetidine wurden aus den entsprechenden Nitrophenoläthern dargestellt.

---



## Literaturverzeichnis.

### Sammelwerke und zusammenfassende Berichte.

- ADAM, N. K., The physics and chemistry of surfaces, Oxford, 1938, a: 58.
- ADRIAN, E. D., The mechanism of nervous action, London and Philadelphia, 1935, a: 29, b: 33, c: 32, d: 36.
- BEUTNER, R., Die Entstehung elektrischer Ströme in lebenden Geweben, Stuttgart, 1920, a: 8 ff., b: 98.
- v. BRAUN, J., Geruch und Konstitution, Ber. dtseh. chem. Ges. 1921, 53, 3619, 1923, 56, 2268, 1924, 57, 373. u. a.
- COHN, G., Die Geschmacksstoffe, Berlin, 1914, a: 739, b: 495, c: 710.
- COHN, G., Die Riechstoffe, Braunschweig, 1924, a: 33, b: 35, c: 27.
- CREMER, M., Abschnitt: *Ursachen der bioelektrischen Erscheinungen*, im Handbuch der norm. und path. Physiologie, Berlin, 1926, Bd 8: 2, a: 999.
- EISTERT, B., Mesomerie und Tautomerie, Stuttgart, 1938, a: 94, b: 32, c: 34, d: 48, e: 100, f: 92.
- FISCHL-SCHLOSSBERGER, Handbuch der Chemotherapie, Leipzig, 1934, a: 343, b: 450, c: 124.
- GURNEY, R. G., Ions in solution, Cambridge, 1935.
- HENNING, H., Der Geruch, Leipzig, 1924, a: 290, b: 176.
- HOFMANN, F. B., Abschnitt: *Der Geruchssinn beim Menschen*, im Handbuch der norm. und path. Physiologie, Berlin, 1926.
- HÜCKEL, E., Z. Elektrochem, 1937, 43, 752, 827.
- HÜCKEL, W., Theoretische Grundlagen der Organischen Chemie, Leipzig 1940, Bd 2, a: 469, b: 472, c: 436, d: 524, e: 246, f: 264.
- KOLMER, W., Abschnitt: *Geruchsorgan*, im Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Berlin, 1928, Bd. 3: 1; a: 201, b: 198.
- LANDSTEINER, K., Die Spezifität der serologischen Reaktionen, Berlin, 1933, a: 82.
- MARRACK, J. R., The Chemistry of Antigens and Antibodies, London, 1938, a: 75, b: 19, c: 152.
- MEYER-GOTTLIEB, Lehrbuch der Pharmakologie, Berlin und Wien, 1936, a: 138.
- OESTERLIN, M., Chemotherapie, Braunschweig, 1939, a: 131, b: 263, c: 236.
- PARKER, G. H., Smell, Taste, and allied Senses in Vertebrates, Philadelphia and London, 1922, a: 32.

- PAULING, L., *The Nature of the Chemical Bond*, New York, 1940, a: 58, b: 60, c: 135, 137, d: 198, e: 154, f: 224.  
 PFEIFFER, P., *Organische Molekülverbindungen*, Stuttgart, 1927, a: 384.  
 RICE, O. K., *Elektronic Structure and chemical Binding*, New York and London, 1940.  
 SCHAEFER, H., *Elektrophysiologie*, Bd. 1, Wien, 1940, a: 214, b: 383, c: 344, d: 254.

### Einzeldarstellungen.

- ADRIAN, E. D., *Boll. Soc. ital. Biol. sper.*, 1938, 13, 257; *Ber. ges. Physiol.*, 1938, 108, 209.  
 ADRIAN, E. D. und LUDWIG, C., *J. Physiol.*, 1938, 94, 441.  
 AMMON, R., Abschnitt: ESTERASEN, im *Handbuch der Enzymologie* (Nord-Weidenhagen), Leipzig, 1940, Bd. 1, 398.  
 ARNDT, F. und EISTERT, B., *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 1935, 68, 193.  
 ARNDT, F., SCHOLZ, H. und FROBEL, E., *Liebigs Ann.*, 1935, 521, 111.  
 BACKMAN, E. L., *Upsala läkarsällskaps Förh.*, 1917, 22, 332.  
 BARTELL, F. E. und MILLER, F. L., *J. Amer. chem. Soc.*, 1928, 50, 1961.  
 BAUR, E., *Ztschr. Elektrochem.*, 1913, 19, 590.  
 BAUR, E., *Ztschr. physikal. Chem.*, 1923, 103, 39; 106, 157.  
 BERGER, E., *Klin. Wschr.*, 1935, 39, 1380.  
 BERGER, E., *Schweiz. Med. Wschr.* 1937, 66, 1309.  
 BERGER, E., *Schweiz. Med. Wschr.*, 1941, 71, 1376.  
 BEUTNER, R., *Science*, 1941, 94, 211.  
 BISHOP, G. H., *Amer. J. Physiol.*, 1927, 82, 462.  
 BOGERT, M. T. und STULL, A., *Amer. Perfumer*, 1925, 20, 453, 1927, 22, 63.  
 BOGERT, M. T., *Amer. Perfumer*, 1936, 32, 51.  
 BOUVEAULT, L. und ROUSSET, L., *Bull. Soc. chim. France* (3), 1894 11, 300.  
 BOVET, J. und ALTMAN, A., *Bull. soc. path. exot.*, 1934, 27, 236, 729.  
 v. BRAUN, J., *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 1911, 43, 2837; 1912, 44, 2869.  
 v. BRAUN, J. und GOSSEL, R., *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 1924, 57, 373.  
 v. BRAUN, J., *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 1926, 59, 2001.  
 v. BRAUN, J., GRUBER, H. und KIRSCHBAUM, G., *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 1922, 55, 3664.  
 v. BRAUN, J., KRÖPER, H., und WIENHAUS, H., *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 1929, 62, 28, 80.  
 BROCKWAY, L. O., BEACH, J. Y. und PAULING, L., *J. Amer. chem. Soc.*, 1935, 57, 2693.  
 BROCKWAY, L. O. und PALMER, K. J., *J. Amer. chem. Soc.*, 1937, 59, 2181.  
 BROWNING, C. H., *Proc. Roy. Soc. London*, 1929, B. 105, 99; weitere Angaben bei OESTERLIN, 178.  
 BUCHTHAL, F. und LINHARD, J., *J. Physiol.*, 1939, 95, 59 P.  
 CATLIN, W. E., *Chem. Abstracts*, 1935, 30, 935.  
 CHAMBERS, L. A., *J. of Immunol.*, 1939, 36, 543.  
 COHEN, R. A. und GERARD, R. W., *J. cellul. and. comp. Physiol.*, 1933, 3, 425.

- CORNUBERT, A., *Compt. Rend.*, 1914, *158*, 1915; *159*, 77.
- CREMER, M., *Ztschr. für Biol.*, 1906, *47*, 1.
- EHRENSVÄRD, G. und EHRENSVÄRD, I., *Skand. Arch. für Physiol.*, 1937, *76*, 279.
- EHRENSVÄRD, G. und SILLÉN, L. G., *Nature*, 1938, *141*, 788; *142*, 396.
- EHRENSVÄRD, G. und SILLÉN, L. G., *Ztschr. Elektrochem.*, 1939, *45*, 440.
- EHRENSVÄRD, G., KARSCHULIN, M. und EHRENSVÄRD, I., *Arkiv för Kemi, Min. och Geol.*, 1939, *13A*, 1.
- EHRENSVÄRD, G. und CHEESMAN, D. F., *Science*, 1941, *94*, 23.
- EHRENSVÄRD, G. und CHEESMAN, D. F., *Svensk kemisk tidskr.*, 1941, *53*, 126.
- ERLENMEYER, H. und BERGER, E., *Biochem. Ztschr.*, 1932, *252*, 22; *255*, 429.
- FISCHER, E., *Ber. dtsch. chem. Ges.*, 1894, *27*, 2992.
- FÖSSBINDER, R. J. und WALTER, L. A., *J. Amer. chem. Soc.*, 1939, *61*, 2032.
- GIBBY, C. W. und ADDISON, C. C., *J. chem. Soc. London*, 1936, 119.
- GILMAN, H. und PICKENS, R. M.: *J. Amer. chem. Soc.*, 1925, *47*, 254.
- GOODSON, J. A., HENRY, T. A. und MACFIE, J. W. S., *Biochem. J.*, 1930, *24*, 874.
- GORDY, W., *J. chem. Physics*, 1939, *7*, 93.
- GRANIT, R. und SVAETICHIN, G., *Upsala läkareförenings Förh.*, 1939, *45*, 161.
- HALLER, A., *Compt. Rend.*, 1913, *157*, 179, 737.
- HAMMICK, D. L. und ILLINGWORTH, W. S., *J. Chem. Soc. London*, 1930, 2358.
- HANSEN, H. L. und FOSDICK, L. S., *J. Amer. chem. Soc.* 1933, *55*, 2872.
- HANTZSCH, A., *Liebigs Ann.*, 1889, *250*, 258.
- HARMS, H., RÖSSLER, H. und WOLF, K., *Ztschr. physikal. Chem.* 1939, B. *41*, 321.
- HASAMA, B., *Pflügers Arch.*, 1934, *234*, 748.
- HARTLINE, H. K., *Amer. J. Physiol.*, 1938, *121*, 400.
- HENDERSON, P., *Ztschr. physikal. Chem.*, 1907, *59*, 118.
- HOFMAN, A. W., *Ber. dtsch. chem. Ges.*, 1887, *20*, 2262.
- HÜCKEL, E., *Ztschr. physikal. Chem.*, 1937, B *35*, 175.
- KARSCHULIN, M., *Ztschr. Elektrochem.*, 1934, *40*, 174, 559; 1936, *42*, 722.
- KARSCHULIN, M. und EHRENSVÄRD, G., *Ztschr. Elektrochem.*, 1938, *44*, 887.
- KYROPOULOS, S., *J. chem. Physics*, 1939, *7*, 57.
- LANGE, J. und HERRE, E., *Ztschr. physikal. Chem.*, 1938, A *181*, 329.
- LILLIE, R. S., *J. Gen. Physiol.*, 1929, *13*, 1.
- LONDON, F., *Ztschr. physikal. Chem.*, 1930, B *11*, 227.
- LUTHER, R., *Ztschr. physikal. Chem.*, 1896, *19*, 529.
- MIETSCHEK, K., *Helvet. Chim. Acta*, 1932, *15*, 172.
- MIETZSCH, F., *Medizin und Chemie (I. G.)* 1936, III, 355.
- MILLS, W. H. und NIXON, I. G., *J. Chem. Soc. London*, 1930, 2510.
- MÜLLER, A., *Amer. Perfumer*, 1936, *32*, 83.

- v. MÖLLENDORFF, W. und TOMITA, T., Ztschr. für Zellforsch. 1925, 3, 1.
- PAAL, C. und SCHIEDEWITZ, H., Ber. dtsh. chem. Ges., 1929, 62, 1935.
- PAULING, L. und WHEELAND, G. W., J. Chem. Physics, 1933, 1, 36.
- RIESENFELD, E. H., Ann. Physik., 1902, 8, 616.
- ROBERTS, R. C. und JOHNSON, T. B., J. Amer. chem. Soc., 1925, 47, 1401.
- RUPE, H. und v. MAJEWSKI, K., Ber. dtsh. chem. Ges., 1900, 33, 3401.
- RUZICKA, L., Chem. Zeit., 1920, 44, 93, 129; Chem. Zentralbl. 1920, I, 590.
- RUZICKA, L., STOLL, M. und SCHINZ, H., Helvet. Chim. Acta, 1926, 9, 249.
- SCHMIDT, O., Ztschr. Physikal. Chem. 1938—39, B 39, 59, B 42, 83; 1939, B 44, 185, 194.
- SCHULMAN, J. H. und HUGHES, A. H., Biochem. J. 1935, 29, 1236, 1242.
- SCHULMAN, J. H. und RIDEAL, E. K., Biochem. J. 1933, 27, 1501.
- SCHULMAN, J. H. und RIDEAL, E. K., Proc. Roy. Soc. London, 1937, B 122, 29.
- SILLÉN, L. G., Physikal. Ztschr., 1939, 40, 466.
- SILLÉN, L. G., Ztschr. Elektrochem., 1939, 45, 442.
- STAUDINGER, H. und MÜLLER, F., Ber. dtsh. chem. Ges., 1923, 56, 711.
- STERN, O., Ztschr. Elektrochem., 1924, 30, 508.
- SVARTHOLM, N. Archiv för Kemi, Min. och Geol. 1942, 15 A, 1.
- ZOTTERMAN, Y., J. Physiol., 1939, 95, 20.



ACTA PHYSIOLOGICA SCANDINAVICA

VOL. 3. SUPPLEMENTUM X.

*Aus der Pharmakologischen Abteilung des Karolinischen Instituts  
und der Medizinischen Klinik des Karolinischen Krankenhauses*

# STUDIEN ÜBER DIE ATROPINGRUPPE

*Untersuchungen über einige  
Wirkungen anticholinergischer Substanzen  
beim Menschen*

*von*

*EBBE NYMAN*

STOCKHOLM 1942



# INHALTSVERZEICHNIS.

	Seite
Vorwort .....	5
Einleitung .....	7
1. Kapitel. Orientierende Übersicht über das cholinergische Nervensystem .....	11
2. Kapitel. Anticholinergische Pharmaka .....	14
A. Natürliche Alkaloide .....	14
B. Synthetische Tropeine und andere Anticholinergica....	19
3. Kapitel. Prüfung der verwendeten Substanzen. Herstellung und Haltbarkeit von Lösungen .....	24
4. Kapitel. Beeinflussung der Speichelsekretion .....	30
A. Frühere Untersuchungen .....	30
B. Eigene Untersuchungen .....	33
1. Methodik .....	33
2. Resultate .....	40
Zusammenfassung .....	54
5. Kapitel. Beeinflussung der Lichtreaktion der Pupille ....	57
A. Frühere Untersuchungen .....	57
B. Eigene Untersuchungen .....	59
1. Methodik .....	59
2. Resultate .....	65
Zusammenfassung .....	69
6. Kapitel. Beeinflussung des Minutenvolumens des Herzens, der Pulsfrequenz und des Blutdrucks .....	71
A. Frühere Untersuchungen .....	71
B. Eigene Untersuchungen .....	75
1. Methodik .....	75
2. Resultate .....	77
Zusammenfassung .....	86



	Seite
7. Kapitel. Beeinflussung der Magensaftsekretion .....	88
A. Frühere Untersuchungen .....	88
B. Eigene Untersuchungen .....	97
1. Methodik .....	97
2. Resultate .....	99
Zusammenfassung .....	111
8. Kapitel. Zusammenfassende Übersicht nebst Betrachtungen über den Zusammenhang zwischen chemischer Kon- stitution und Wirkungsstärke anticholinergischer Sub- stanzen .....	113
Schrifttum .....	122

## VORWORT.

Die vorliegende Arbeit ist in der Pharmakologischen Abteilung des Karolinischen Instituts sowie in der Medizinischen Klinik und dem Physiologischen Laboratorium des Karolinischen Krankenhauses ausgeführt worden. Für wohlwollendes Interesse und wertvolle Unterstützung in verschiedenen Formen bin ich den Leitern der betreffenden Institutionen, Herrn Professor Göran Liljestrand und Frau Professor Nanna Svartz, zu grösstem Dank verpflichtet.

Für wichtige Ratschläge und Orientierung spreche ich Herrn Professor Torsten Teorell und Herrn Doktor Carl-Olof Oldfelt an dieser Stelle nochmals meinen besten Dank aus.

Unter meinen zahlreichen Versuchspersonen gebührt besonderer Dank Herrn Studierenden Eric Östlund, welcher durch überaus zuverlässige und verständnisvolle Mitwirkung die Durchführung der Untersuchung erleichtert hat.

Eine Menge Analysenarbeit, zu welchen ich selbst nicht Zeit fand, ist in dankenswerter Weise von meiner Frau (Aziditäts- und Chloridbestimmungen an Magensaft) und von Frau E. Kornerup und Fräulein M. Berg (Gasanalysen bei Kreislaufuntersuchungen) ausgeführt worden.

Für die sorgfältige Übersetzung ins Deutsche danke ich Herrn Dr. med. Robert Hirschfeld.

Schliesslich bitte ich, meinen ergebensten Dank für Beiträge seitens Stiftelsen Therese och Johan Andersons Minne und Svenska Sällskapet för Medicinsk Forskning, durch welche die Arbeit ermöglicht wurde, aussprechen zu dürfen.

Stockholm im März 1942.

EBBE NYMAN



## EINLEITUNG.

Als krampf lösende und sekretionshemmende Mittel sind Alkaloide der Atropingruppe und verschiedene synthetische Ersatzpräparate für diese seit langem bei der Therapie verschiedener Krankheitszustände im Gebrauch gewesen. Ihrer Wirkung liegt eine mehr oder minder ausgesprochene Hemmung parasympathischer Funktionen zugrunde, die früher als eine Lähmung parasympathischer Nervenendigungen aufgefasst wurde, heutzutage aber, und zwar sicherlich mit grösserer Berechtigung, als spezifischer Antagonismus gegen das von parasympathischen Nervenendigungen produzierte Azetylcholin erklärt wird, welches durch die Atropinalkaloide daran gehindert wird, seine Wirkung auf das Effektororgan auszuüben. Im Einklang hiermit hat die Bezeichnung „cholinergische“ statt „parasympathische“ Funktion immer weitere Verbreitung gefunden. Die Ausdrücke „parasympathisch lähmend“ oder „Parasympathicolytica“ dürften folglich bei den Atropinalkaloiden und Substanzen mit gleicher Wirkung nicht ganz treffend sein. Statt dessen wird vorgeschlagen, diese Pharmaka als *anticholinergische* Substanzen zu bezeichnen, ein Name, von dem im folgenden in vorliegender Arbeit Gebrauch gemacht werden wird.

Anticholinergische Substanzen haben namentlich als symptomatische Mittel bei verschiedenen Magen- und Darmleiden in grossem Umfang Verwendung gefunden. Ihr Einfluss auf den Herzvagus hat auch die therapeutische Anwendung bei gewissen Herzkrankheiten veranlasst, und ferner schloss man aus der im Tierversuch nachgewiesenen dilatierenden Wirkung auf die Koronararterien, sie seien bei Zirkulationsstörungen in diesen Gefässen indiziert. Auch Veränderungen des Tonus und der Sekretionsverhältnisse der Bronchen sind mit einschlägigen Medikamenten bekämpft worden. Überhaupt gibt es wenig interne Krankheitszustände, bei welchen der Tonus der glatten Muskulatur irgendeine Rolle spielt, wo diese Substanzen in der einen oder anderen Form nicht versucht worden wären.



darstellen muss. Ferner machen sich Mängel in unserem Wissen über den relativen Effekt verschiedener anticholinergischer Substanzen auf die einzelnen cholinergischen Organfunktionen stark fühlbar. Diese letzteren Verhältnisse beim Menschen behandelnde Untersuchungen fehlen im zugänglichen Schrifttum fast gänzlich.

In der vorliegenden Arbeit suchte Verf. unsere Kenntnisse in einigen oben angeführten Punkten zu erweitern. Experimentell und an klinischem Material sind eine Reihe der bekanntesten Anticholinergica hinsichtlich ihrer quantitativen Wirkungen auf solche cholinergische Funktionen untersucht worden, welche sich als objektiven Messungen zugänglich erwiesen haben.

Es ergab sich bald, welche cholinergischen Funktionen beim Menschen den Anforderungen an quantitative, objektive Messbarkeit genügten. Zur Auslösung solcher Funktionen sind indessen bei Untersuchungen dieser Art reproduzierbare Stimuli erforderlich. Ein für alle cholinergischen Funktionen gemeinsam anwendbares Reizmittel, welches experimentell die obige Bedingung erfüllt, existiert leider nicht. Das physiologische Agens, das Acetylcholin, hat auf cholinergische Funktionen des Menschen bei exogener Zufuhr einen unsicheren und nicht selten quantitativ unbefriedigenden Effekt, was auf der Geschwindigkeit beruht, mit der dasselbe im Organismus gespalten wird. Die stabileren synthetischen Cholinester besitzen in der Regel keine hinreichend starke Wirkung auf die zu untersuchenden Organfunktionen, ohne gleichzeitig unerwünschte Nebenwirkungen seitens der Kreislauforgane auszulösen.

Verf. hat aus diesen Gründen für jede Funktion ein stark wirksames sowie möglichst spezifisches Reizmittel ausgewählt. Dass sich hierbei die Bedingung einer strikt physiologischen Wirkung nicht immer aufrechterhalten lässt, ist ein Nachteil, der jedoch von untergeordneter Bedeutung ist, wenn es sich um Vergleiche der Stärke verschiedener hemmender Substanzen handelt. Die wesentlichste Voraussetzung ist offenbar, dass das angewandte Reizmittel solche Eigenschaften hat, dass sich der Effekt der Reizung in physiologischen Grenzen hält und mit hinreichender Genauigkeit reproduzierbar ist.

Folgende Funktionen und Reizmittel sind bei der vorliegenden Arbeit auf ihre Beeinflussbarkeit mittels Anticholinergica untersucht worden:

1. Die *Speichelsekretion* der Glandula parotis, mit Pilokarpin in einmaliger, subkutaner Dosis oder durch kontinuierliche intravenöse Zufuhr hervorgerufen.

2. Die *Sphinkterfunktion der Pupille* unter dem Einfluss des naturgemässen Reizmittels, des Lichtes.

3. *Frequenz und Minutenvolumen des Herzens*. Infolge der Eigenschaft des Vagus, die Herzfrequenz zu hemmen, war ein besonderes Reizmittel hier nicht erforderlich. Gleichzeitig wurden in gewissen Fällen Blutdruck und periphere Zirkulationsverhältnisse registriert.

4. Die *Magensaftsekretion*, mit Histamin ausgelöst; der Magensaft wurde hierbei mittels Dauerausheberung durch Doppelsonde gewonnen.

Obwohl die Funktionen des cholinergischen Systems beim Menschen mit den oben aufgezählten bei weitem noch nicht erschöpft sind, hat es sich doch als unmöglich erwiesen, irgendwelche andere cholinergische Funktionen im menschlichen Organismus auf befriedigende Weise zu registrieren.

Von ganz besonderem Interesse wäre selbstverständlich eine quantitative Studie über die Motorik des Magen-Darmkanals hinsichtlich ihrer Beeinflussbarkeit durch Anticholinergica gewesen, da dies ja der allgemeinen Ansicht nach gerade das Gebiet ist, auf welchem die einschlägigen Pharmaka durch ihre spasmolytische Wirkung eine ihrer vornehmsten therapeutischen Aufgaben als schmerzlindernde Mittel zu erfüllen haben. Zu einer sicheren Beurteilung der äusserst komplizierten autonomen Innervationsverhältnisse im Bereich des Magen-Darmkanals in bezug auf ihre Pharmakologie beim Menschen gehört jedoch ein grosses Material von Röntgenaufnahmen, weshalb Verf. unter den jetzigen Zeitumständen auf eine Untersuchung dieser Funktionen Verzicht leisten musste. Eine quantitative Analyse der cholinergisch gesteuerten Schweissekretion wurde leider durch unüberwindliche technische Schwierigkeiten vereitelt.

## 1. Kapitel.

### Orientierende Übersicht über das cholinergische Nervensystem.

Das parasympathische System besteht der klassischen Einteilung nach aus einem kranial-bulbären und einem sakralen Abschnitt im Zentralnervensystem. Die Bezeichnung „parasympathisch“ im Gegensatz zu sympathisch wurde von LANGLEY (1905) eingeführt, dessen pharmakologische Arbeiten die Existenz eines grundsätzlichen Unterschieds zwischen diesen beiden Teilen des autonomen Nervensystems aufdeckten. Später glaubten KEN KURÉ und seine Mitarbeiter (1928, 1936) das Vorkommen von Bahnen nachweisen zu können, welche von Zentren des kranial-bulbären Abschnitts ausgehen, dann im Rückenmark verlaufen und dieses zusammen mit den hinteren Wurzeln verlassen, um zur Peripherie zu ziehen, wo die Blutgefäße der Haut von ihnen ihre dilatatorische Innervation empfangen. Womöglich erhalten auch die Schweißdrüsen auf diesem Wege sekretionsfördernde Impulse. Nach DALE und FELDBERG (1934) sind jedoch die sekretorischen Nervenfasern der Schweißdrüsen sympathischen Ursprungs, wenngleich funktionell cholinergisch.

Wesentliche Aufschlüsse über die Physiologie des autonomen Nervensystems verdanken wir den Untersuchungen von DALE (1914) über das Azetylcholin und dem von LOEWI (1921) erbrachten Nachweis, dass Reizung des Herzvagus eine periphere Freimachung eines sogenannten „Vagusstoffs“ zur Folge hat. LOEWI und NAVRATIL (1926) konnten später zeigen, dass der Vagusstoff mit Azetylcholin identisch ist. Diese Produktion von Azetylcholin, welches dem Effektororgan den Reiz vermittelt, ist, wie sich bald ergab, eine generelle Erscheinung im Bereich des parasympathischen Systems. Aus diesem Grunde schlug DALE (1933) die Bezeichnung „cholinergisch“ für diejenigen Fasern vor, deren Effekt vom Azetylcholin übermittelt wird. Der anatomische



Begriff „Parasympathicus“ deckt indessen das cholinergische System nicht völlig, welches eine grössere Reichweite hat. So ist der präganglionäre Abschnitt des ganzen autonomen Nervensystems cholinergisch. Das gleiche soll für die motorischen Nerven der quergestreiften, dem Willen unterworfenen Skelettmuskulatur gelten, deren Entwicklungsgeschichte die Verwandtschaft derselben mit autonomen, präganglionären Bahnen offenbar macht.

Neben dem Azetylcholin, der adäquaten und physiologischen Vermittlungssubstanz des cholinergischen Systems in vivo, gibt es eine Reihe anderer Substanzen mit mehr oder weniger selektiver und starker Wirkung ähnlicher Art. Einen Teil derselben hat man seit langem in die sog. Muskaringruppe zusammengefasst. Hierzu gehören u. a. Muskarin, Physostigmin und Pilocarpin. In den letzten Jahren sind einige synthetische Cholinester hinzugekommen, z. B. Karbaminoylcholin und Azetyl- $\beta$ -Methylcholin. Alle die Mittel, deren Wirkung an den Effekt erinnert, welcher bei Reizung cholinergischer Fasern erzielt wird, nennt man zusammenfassend Parasympathicomimetica. Während die Mehrzahl derselben einen direkten Reiz auszuüben scheinen, ist bezüglich des Physostigmins von LOEWI und NAVRATIL (1926) nachgewiesen worden, dass die Wirkung dieser Substanz in einer Verhinderung der fermentativen Spaltung des auf natürlichem Wege freigemachten Azetylcholins besteht. Das gleiche scheint für das synthetische Mittel Prostigmin zuzutreffen.

Die früher allgemein verbreitete Anschauung, dass anticholinergisch wirkende Mittel, zu welchen in erster Linie die Alkaloide der Atropingruppe gehören, ihre hemmende Wirkung direkt auf parasympathische Nervenendigungen ausüben sollten, dürfte sich nicht länger aufrechterhalten lassen. Es verhält sich statt dessen wahrscheinlich so, dass die anticholinergischen Pharmaka in der Weise wirken, dass sie den direkten oder von irgendeinem Zwischenglied vermittelten Einfluss des Azetylcholins auf das Effektororgan verhindern. Diese Auffassung wurde zuerst von LOEWI und NAVRATIL (1924) vertreten, welche zeigten, dass auch das atropinisierte Froschherz bei Vagusreizung Azetylcholin freimacht. Dies wäre undenkbar, wenn der Atropineffekt proximal von dem Niveau einsetzen würde, in welchem das Azetylcholin bei der Nervenreizung frei wird. Dass das freigemachte Azetyl-

cholin gleichwohl wirkungslos bleibt, muss darauf beruhen, dass dessen Einfluss auf das Effektororgan vom Atropin in irgendeiner Weise unterdrückt wird. Ähnliche Erfahrungen wurden bald von verschiedenen Seiten mit Bezug auf andere cholinergische Funktionen veröffentlicht. So bestätigten z. B. RYLANT und DEMOOR (1927) diese Beobachtungen durch Untersuchungen am Säugetierherz, ENGELHART (1931) an der Oculomotoriusfunktion, GIBBS und SZELÖCZEY (1932), HENDERSON und ROEPKE (1933) bezüglich der Speichelsekretion sowie DALE und FELDBERG (1934) hinsichtlich der sog. psychischen Phase der Magensaftsekretion. Ähnliche Erfahrungen wurden von LISSÁK und MARTIN (1940) gemacht, welche auch den Schluss ziehen, dass die früher strikt aufrechterhaltene Grenze zwischen neuronalen und muskulären spasmolytischen Wirkungen (z. B. Atropin-Papaverin) nunmehr kaum gerechtfertigt ist. Sie geben jedoch zu, dass man nach wie vor einen Unterschied gelten lassen muss. Während die anticholinergischen Mittel ihren hemmenden Einfluss im muskulären oder sekretorischen Endorgan dadurch entfalten, dass sie das Eingreifen des Azetylcholins verhindern, können Alkaloide der Papaveringruppe eine unmittelbare spasmolytische Wirkung direkt in der glatten Muskulatur ausüben, unabhängig von Innervation oder vermittelnden Instanzen. In der Tat dürften gewisse neuere Spasmolytika synthetischer Art die beiden obigen Wirkungsmodi in sich vereinen. Ferner sprechen KREITMAIRS (1938) Untersuchungen über die Alkaloidreihe l-Hyoseyamin-Atropin-Apoatropin-Belladonin offensichtlich dafür, dass im Laufe der alkaloiden Umwandlung die „neuronalen“ Wirkungen abnehmen, während die direkt „muskulären“ an Stärke gewinnen.<sup>1</sup>

Ein Umstand, welcher die Deutung der Wirkungsweise anticholinergischer Pharmaka fernerhin kompliziert, ist, dass die sekretionsfördernde Wirkung des Histamins auf den Magen bis zu einem gewissen Grade durch Atropin gehemmt werden zu können scheint, was nach GRAY (1937) mit der geltenden Anschauung von der lediglich humoralen und direkten Drüsenzellwirkung des Histamins augenscheinlich unvereinbar ist.

<sup>1</sup> KREITMAIR gibt folgende Verhältniszahlen der neuronalen Wirksamkeit der Alkaloidreihe an: l-Hyoseyamin : Atropin : Apoatropin : Belladonnin = 2 : 1 :  $\frac{1}{50}$  :  $\frac{1}{30\,000}$ . Die Zahlen der direkten, muskulären Wirkung sind: l-Hyoseyamin : Atropin : Apoatropin = 1 : 1 : 5.

## 2. Kapitel.

### Anticholinergische Pharmaka.

#### A. Natürliche Alkaloide.

*Hyoscyamine.* Die in der Natur vorkommenden Alkaloide der Atropingruppe, oft auch Belladonnaalkaloide genannt, sind fast ausschliesslich in der Pflanzenfamilie der Solanazeen zu finden. Die Kenntnis gewisser ihrer charakteristischen Wirkungen ist eine uralte Überlieferung, die sicherlich im Volk schon jahrhundertlang recht verbreitet gewesen war, ehe die ärztliche Wissenschaft sich diese Drogen zunutze machte.

Die wissenschaftliche Entdeckung des praktisch wichtigsten der Belladonnaalkaloide, des Atropins, ist das Verdienst von MEIN (1831). GEIGER und HESSE (1833) isolierten die hochaktive, linksdrehende Komponente desselben, das l-Hyoscyamin. Die ersten systematischen Untersuchungen über die Pharmakologie des Atropins wurden von KRAUT (1863) vorgenommen. Die Synthese des Atropins wurde von LADENBURG in einer Reihe klassischer Arbeiten beschrieben, deren erste im Jahre 1879 erschien. Seine Untersuchungen wurden von WILLSTÄTTER und dessen Mitarbeitern vollendet, welche nach über 20jähriger Arbeit diejenige Konstitutionsformel für Atropin angegeben haben, welche die heutzutage allgemein anerkannte ist. In bezug auf Einzelheiten dieser imponierenden Untersuchungen wird auf eine Monographie von TRIER (1931) verwiesen.

Das Atropin oder d-, l-Hyoscyamin, eine esterartige Verbindung des basischen Alkohols Tropin und der optisch aktiven Tropa-säure, findet sich der heutigen Ansicht nach nur in geringer Menge präformiert in denjenigen Pflanzenteilen, aus welchen es dargestellt wird. Wahrscheinlich entsteht das Atropin zum grössten Teil bei den präparatorischen Massnahmen durch Razemisierung von l-Hyoscyamin, welches die im eigentlichen Sinne natürliche Alkaloidform sein dürfte. Das razemische Atropin wird für ein

Gemisch gleicher Teile von l- und d-Hyoscyamin gehalten. Die Bausteine des Atropins, Tropin und Tropasäure, besitzen gesondert die für das Alkaloid charakteristischen pharmakologischen Eigenschaften nicht in nennenswertem Grade. In diesem Zusammenhang soll darauf hingewiesen werden, dass im Schrifttum über die Nomenklatur der Hyoscyamine keine Einigkeit herrscht. Gewisse Autoren, z. B. PFANKUCH in HOUBENS Handbuch (1939), meinen mit der Bezeichnung Hyoscyamin nur die linksdrehende Form, während beispielsweise v. OETTINGEN in HEFFTERS Handbuch (1937) den Namen für beide Formen gebraucht und dieselben als l- bzw. d-Hyoscyamin kennzeichnet. In der vorliegenden Arbeit wird v. OETTINGENS Nomenklatur angewendet.

Über den anticholinergischen Wirkungsgrad des Atropins und der beiden Hyoscyaminformen hat CUSHNY (1904, 1920) die ersten gründlichen vergleichenden Untersuchungen angestellt. In Versuchen mit möglichst reinen Präparationen an der Katzenpupille, dem Warmblüterherz und an durch Pilocarpin hervorgerufener Speichelsekretion beim Hund und der Katze konnte C. feststellen, dass das l-Hyoscyamin ungefähr doppelt so aktiv ist wie das Raze-mat, während das d-Hyoscyamin nur ca.  $\frac{1}{40}$  der Stärke des l-Hyoscyamins besitzt. In Untersuchungen über den mydriatischen Effekt der Hyoscyamine am Rattenauge vermochte u. a. PULEWKA (1932) die von CUSHNY angegebenen Stärkeverhältnisse zu bestätigen.

Eine sehr grosse Anzahl Forscher haben sich mit der Wirkung der Hyoscyamine auf die Darmmotilität beschäftigt, einmal um den prinzipiellen Effekt derselben zu ergründen, sodann auch um quantitative Aufschlüsse zu erhalten. Zu diesem Zweck sind eine Reihe verschiedene Methoden ausgearbeitet worden. Die Mehrzahl der Untersucher haben mit isoliertem Darm gearbeitet. Hier können nur in Kürze diejenigen Resultate wiedergegeben werden, welche sich auf Vergleiche der Stärke verschiedener anticholinergischer Substanzen beziehen.

Von den widersprechenden Ergebnissen ausgehend, zu welchen ältere Forscher hinsichtlich des Einflusses von Atropin auf die Darmmotilität gekommen waren, betonte LILJESTRAND (1919), dass ein wechselnder Gehalt verschiedener Atropinpräparationen an optisch aktivem Hyoscyamin als Erklärung für die Verschie-

denheit der Resultate einzelner Untersueher in Betraecht gezogen werden könnte. Obwohl sich diese Annahme bei einigen verschiedenen untersuchten Atropinzubereitungen als richtig erwies, konnte L. bei seinen Versuehen an u. a. isoliertem Kaninehendarm weder qualitative noch quantitative Unterschiede in den Wirkungen von Atropin und l-Hyoseyamin bezüglich des Antagonismus dieser Substanzen gegen Pilocarpin nachweisen. Diese Beobachtungen veranlassten die Schlussfolgerung: „Der Zustand des Darmes selbst ist also wahrseheinlich von entscheidendem Einfluss auf die Reaktionsweise“.

Dureh LE HEUXs (1918) Nachweis der Freimaechung von Cholin im Darm kam diese Frage in eine neue Lage. LE HEUX (1920) war imstande, zu zeigen, dass die wechselnde Reaktion auf Atropin von der Menge des anwesenden Cholins abhängig war. Infolge der verwickelten und schwer zu kontrollierenden Verhältnisse, welche in bezug auf die Atropinwirkung am überlebenden Darm obwalten, schlägt ROTHLIN (1924) eine andere Methodik zur quantitativen Bestimmung von Belladonnaalkaloiden vor. Bei Versuehen mit elektriseher Vagusreizung und Registrierung des Blutdruckfalls beim Kaninehen konstatierte R. eine direkte Proportionalität zwischen Atropindosis und Wirkungszeit. Das l-hyoseyaminhaltige Präparat Bellafofin war doppelt so wirksam wie das Atropinsulfat. Weitere quantitative Vergleiche mit dieser Methode scheinen indessen nicht ausgeführt worden zu sein.

Dasselbe Stärkeverhältnis l-Hyoscyamin-Atropin = 2:1, welches CUSHNY gefunden hatte, stellten u. a. JENDRASSIK und WILL (1930) bei Versuehen an isoliertem Kaninehendarm fest, der in einer konstanten Pilocarpinlösung fungierte.

Nach v. OETTINGEN und MARSHALL (1934) sollten die von CUSHNY und anderen Untersuchern nachgewiesenen Stärkeverhältnisse nur für gewisse Funktionen gelten und von einem Tierindividuum zum anderen wechseln. Obgleich sie bei Kaninehen schwankende Relationen zwischen dem Effekt des l-Hyoscyamins und dem des Atropins beobachtet, konnten sie in keinem Falle konstatieren, dass die Wirkung des l-Hyoscyamins stärker war als die des Atropins. Um diese Beobachtungen zu beleuchten wurde die Geschwindigkeit bestimmt, mit der die einzelnen Substanzen von Kaninchenserum zerstört wurden. Dabei ergab sich, dass

l-Hyoscyamin erheblich rascher vernichtet wurde als Atropin, während d-Hyoscyamin die grösste Resistenz aufwies. Die Autoren erblicken in diesen Umständen die Erklärung der Abweichungen von den CUSHNYschen Resultaten und stehen auf dem Standpunkt, auch der von CUSHNY wahrgenommene starke Effekt des d-Hyoscyamins auf das Zentralnervensystem des Frosches finde hierdurch eine natürliche Erklärung.

Die somit ziemlich reichlich dokumentierte Stärkebeziehung zwischen dem Razemat Atropin und seinen optisch aktiven Komponenten kann generell durch die oft angeführte Annahme erklärt werden, dass die Wirkung des Atropins hauptsächlich auf der linksdrehenden Komponente beruht, während der wenig aktive, rechtsdrehende Bestandteil nichts anderes als ein Faktor ist, welcher den Effekt des l-Hyoscyamins sozusagen auf die Hälfte verdünnt. Das Razemat Atropin soll nur in fester Form existieren. In Lösung zerfällt dasselbe in gleiche Teile der beiden optisch aktiven Komponenten.

*Apoatropin* (Atropyltropin oder Atropamin) gehört, wie man meint, ebenfalls in gewissem Umfang zu den in den Solanazeen präformierten Alkaloiden. Es ist jedoch wie beim Atropin auch beim Apoatropin vermutet worden, dass es im wesentlichen ein Produkt der Präparierung wäre. Nach KREITMAIR (1938) tritt beim Erhitzen von l-Hyoscyamin auf 110° folgendes ein: durch Razemisierung bildet sich Atropin, das unter Wasserabgabe in Apoatropin übergeht, welches seinerseits in das gesättigte Belladonnin umgewandelt wird.

Das Apoatropin ist zuerst von HESSE (1891) nachgewiesen worden. Eine geringe mydriatische Wirkung will KOBERT (1905) festgestellt haben, aber LEWIN und GUILLERY (1905) konnten diese Beobachtung nicht bestätigen. Das Apoatropin hat einen reizenden Effekt auf das Zentralnervensystem, welcher von ALBERTONI und MARCACCI (1884) erstmals untersucht wurde. Nachdem das Mittel während einer langen Reihe von Jahren kaum beachtet worden war, erhielt es durch Untersuchungen von KÜSSNER (1938) und KREITMAIR (1938) in den Laboratorien von Merck bei Gelegenheit der Suche nach den Ursachen der angeblichen Überlegenheit der sog. bulgarischen Kur über galenische Atropinzuberei-

tungen bei der Behandlung von enzephalitischen Folgezuständen Aktualität. Bei einer systematischen Untersuchung über die Pharmakologie des Apöatropins fanden KREITMAIR und WOLFES (1938), dass diese Substanz eine direkte muskuläre Wirkung auf den Darm, aber kaum irgendeinen Effekt auf parasympathisch gesteuerte Funktionen besitzt, und dass sie ein ausgesprochenes Krampfgift für das Zentralnervensystem ist. Was die Toxizität des Mittels beim Menschen betrifft, so behauptete DUENSING (1938), gestützt auf Erfahrungen bei der Behandlung von Enzephalitikern, dass eine Dosis von 20 mg pro die von den meisten Menschen vertragen wird.

*Hyoszine.* Diese kommen gleichfalls in der Natur in gewissen Solanazeen vor und wurden 1882 von LADENBURG entdeckt. Die Hyoszine sind nach WILLSTÄTTER und BERNER (1923) Ester der Base Skopin und der optisch aktiven Tropasäure. Ebenso wie bei den Hyöseyaminen gibt es drei Formen, ein gewöhnlich Atroszin genanntes Razemat, eine linksdrehende Form, Skopolamin, und eine rechtsdrehende, d-Hyoszin. Im Gegensatz zu dem Verhalten bei der Atropindarstellung scheint bei der Präparierung keine Razemisierung nennenswerten Grades stattzufinden, weshalb die Ausbeute hauptsächlich aus Skopolamin besteht.

Von der grossen Anzahl älterer Untersuchungen über die Pharmakologie des Skopolamins seien hier nur die von KOBERT (1887) und KOCHMANN (1904) erwähnt, in welchen die prinzipielle Übereinstimmung mit der Atropinwirkung nachgewiesen wurde. Schon an diesem Zeitpunkt war der stark hemmende Effekt des Skopolamins auf das Zentralnervensystem bekannt, und die Kombinationsnarkose mit Morphin ist nach SCHNEIDERLIN seit dem Jahre 1900 dauernd im Gebrauch.

CUSHNY und PEEBLES (1904—05) verglichen die Stärkeverhältnisse der einzelnen Hyoszine und fanden dabei u. a., dass das Skopolamin hinsichtlich des Effekts auf Herzvagus und Speicheldrüsen im Tierversuch doppelt so stark wirkte wie das Razemat, sowie dass alle drei Hyoszine eine gleich starke zentrale Wirkung zu besitzen schienen, während die peripheren Wirkungen des d-Hyoszins sehr schwach waren. Das Razemat war in einem einzigen Speichelversuch gleichstark mit Atropinhydrobromid.

## B. Synthetische Tropeine und andere Anticholinergica.

Für das therapeutische Problem der viszeralen, durch eine Erhöhung des Tonus glatter Muskulatur bedingten Schmerzen kommen im wesentlichen zwei verschiedene Angriffspunkte in Betracht: einerseits lässt sich eine Verminderung der subjektiven Bewertung der Schmerzregistrierung durch Analgetica erzielen, andererseits kann der für die Schmerzempfindung verantwortliche „Spasmus“ der glatten Muskulatur verringert werden. Diese „Spasmolyse“ ihrerseits kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen, entweder durch eine Hemmung der autonomen Impulse zum Effektororgan, einen „neuralen“ Einfluss, oder durch einen direkt „muskulären“ Effekt. Da die natürlichen Belladonnaalkaloide mit anticholinergischer Wirkung neben ihrer autonomen Hemmung der viszeralen Muskulatur noch eine Reihe von peripheren Wirkungen teilweise lästiger Art ausüben, ist es begreiflich, dass man den Modus agendi derselben so zu modifizieren suchte, dass die in einer gegebenen therapeutischen Situation unerwünschten Nebenwirkungen zugunsten der angestrebten Resultate zurücktreten. Eine Steigerung des spasmolytischen Einflusses auf glatte Muskulatur und gleichzeitig eine Verringerung des Effekts auf Speicheldrüsen, Augen und Cerebrum haben, wie man sagen könnte, im grossen ganzen das Ziel der Bestrebungen dargestellt, das Wirkungsprinzip des Atropins durch molekulare Veränderungen zu modifizieren.

Einer der ersten Versuche in dieser Richtung betraf die Darstellung von Tropinestern anderer organischer Säuren als der Tropasäure. So synthetisierte LADENBURG (1883) Homatropin, einen Tropinester der Mandelsäure, der, wie sich ergab, Atropinwirkung besass, wenn auch wesentlich abgeschwächt. JENDRASSIK und WILL (1930) haben bei Versuchen an isoliertem Kaninchen Darm nachgewiesen, dass der Effekt des Homatropins etwa  $\frac{1}{10}$  der Atropinwirkung ausmacht. Bezüglich des Homatropins ist sonst noch geltend gemacht worden, dass dasselbe in seiner Eigenschaft als Mandelsäurederivat ausserdem einen direkt muskulären, dem des Papaverins analogen Angriffspunkt habe. Der Unterschied in der Wirkungsstärke der optischen Isomere im Ver-



gleich zueinander wird als erheblich geringer als bei den Hyosyaminen bezeichnet. CUSHNY (1920) gibt die Verhältnisse l-Form : Razemat : d-Form mit 2:1,4:1 an. Im Laufe des weiteren Suchens nach geeigneten Ersatzmitteln für Atropin wurde bald ersichtlich, dass auch sehr kleine Modifikationen des Moleküls hinreichend waren, um den spezifischen anticholinergischen Effekt beträchtlich zu reduzieren. Hier sei lediglich an Apoatropin erinnert, welches sich vom Atropin nur durch Abspaltung eines Moleküls Wasser unterscheidet, anticholinergische Eigenschaften aber fast gänzlich vermissen lässt. Die Mehrzahl sämtlicher der zahlreichen Tropinester organischer Säuren, welche im Lauf der Jahre dargestellt worden sind, haben infolge ihrer abgeschwächten spezifischen Wirkungen auch keine praktische Bedeutung erlangt. Eine ins einzelne gehende Schilderung der mydriatischen Wirkung bei einer Reihe derartiger Derivate findet man bei PYMAN (1917). Einige dieser Verbindungen sind auch von CUSHNY (1920) in Versuchen mit pilokarpinstimulierter Speichelsekretion beim Hunde erprobt worden. Eine kleine Anzahl hatten dabei eine schwache, dem Atropin analoge Wirkung, z. B. die Benzoyl- und Oxybenzoyltropine, ca.  $\frac{1}{300}$  des Atropineffekts.

Nach FROMHERZ (1933) wird die spezifische Wirkung nur dann in nennenswertem Grade beibehalten, wenn die ersetzende organische Säure eine der Tropasäure nahe verwandte chemische Konstitution hat. Zu dieser Gruppe relativ aktiver Präparate gehört das Homatropin, ferner ein Atropinisomer, das Atrolactyltropin oder Pseudoatropin sowie das Atroglyceryltropin.

Hinsichtlich weiterer Einzelheiten über Tropinester verschiedener organischer Säuren wird auf v. OETTINGENS Übersicht in HEFFTERS Handbuch (1937) verwiesen, wo über 40 Verbindungen aus dem Schrifttum zusammengestellt sind. Es sind Tropinester von u. a. substituierten Benzoesäuren, Hydratropasäuren, Phenyl-essigsäuren und Phenylpropionsäuren. Die meisten dieser Verbindungen sind heutzutage nichts anderes mehr als Zeugen der enormen Arbeit, welche in Jahrzehnten darauf verwendet worden ist, gute Ersatzmittel für das Atropin zu schaffen.

Von grösstem theoretischem und praktischem Interesse sind diejenigen Derivate des Atropins und Homatropins, in welchen

das Tropin in eine quartäre Ammoniumbase umgewandelt worden ist. Schon 1869 hatten BROWN und FRASER den Effekt von Salzen des Methylatropins untersucht und dabei beobachtet, dass die zentrale Reizung im Vergleich zu der des Atropins erheblich reduziert war. ERBE (1903) führte eine ausgedehnte Untersuchung an u. a. klinischem Material durch, bei der er das Fehlen einer zentralen Reizung durch therapeutische Dosen bestätigen konnte. Er wies ferner am Katzenauge nach, dass der mydriatische Effekt wenigstens nicht geringer war als der des Atropins.

v. ISSEKUTZ (1917) führte das Methylnitrat des Homatropins (Novatropin) ein, ebenfalls eine quartäre Ammoniumbase, und fand, dass das neue Mittel beträchtlich stärkere anticholinergische Wirkungen hatte als die Stammverbindung. Er konnte auch demonstrieren, dass der Übergang des Atropins und Homatropins in quartäre Ammoniumbasen eine markante curareartige Wirkung auf motorische Nervenendigungen mit sich brachte, während die zentrale Reizung beim Frosch 30—50mal geringer wurde. Der Vaguswirkung beim Frosch war 8fach gesteigert.

TRENDELENBURG (1913) veresterte bei sowohl Atropin wie Skopolamin das Alkoholradikal der Tropasäure mit Schwefelsäure. Hierdurch wurde der anticholinergische Effekt beträchtlich abgeschwächt, während eine erhebliche Ventilationssteigerung zu beobachten war.

Eine andere Modifikation des Tropinteils im Molekül wurde von POLONOWSKI (1925) durchgeführt, welcher hierdurch die quartäre Ammoniumbase Atropin-N-Oxyd (Genatropin) darstellte. Er gibt an, dass die Wirkung desselben eine langsamere sei als die des Atropins, und hält das Mittel für weniger toxisch. Nach HAFERKORN und LENDLE (1935) ist der Effekt desselben  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{5}$  von dem des Atropins, bei sonst gleichen Eigenschaften.

In analoger Weise stellte P. auch ein Skopolamin-N-Oxyd dar, dessen Toxizität geringer als die des Skopolamins sein soll.

Eine andere Variation hat HARRIES (1897) eingeführt, welcher einen salzsauren Mandelsäureester des N-Methylvinyl-diazetonalkamins darstellte. Trotz der verhältnismässig grossen Abweichung vom Homatropin hat diese Mittel einen deutlichen mydriatischen Effekt. Nach PEWSNER (1906) soll die Substanz, welche Euphthal-

min genannt wird, schon in kleinen Dosen einen hemmenden Einfluss auf die Magensaftsekretion beim Hund ausüben.

v. BRAUN und seine Mitarbeiter RÄTH und BRAUNSDORF (1918, 1920, 1922) behielten die Tropasäure unverändert bei und variierten den anderen Teil des Atropinmoleküls. Von den zahlreichen Präparationen dieser Forscher hatte eine, wie sich zeigte, einen mydriatischen Effekt, welcher dem des Atropins entsprach. Es handelte sich um einen als Mydriasin bezeichneten Tropasäure-ester des Homotropins (eines Tropinhomologs). Veränderungen des Atropin- und Homatropinmoleküls in den oben angeführten Richtungen führen dazu, dass die bei den Stammverbindungen kaum angedeutete lokalanästhetische Wirkung immer mehr zum Vorschein kommt. Nahe verwandt mit den synthetischen örtlichen Betäubungsmitteln vom Typ des Novokains ist somit das von TODA (1929) dargestellte Atropinersatzmittel Navigan, ein Azetyltropasäureester des Piperidinoäthanols. Diese Verbindung hat laut Angabe einen deutlichen mydriatischen Effekt sowie eine anticholinergische Wirkung auf die Speichelabsonderung und den Darm im Tierversuch.

Die neueste Errungenschaft in der Kette der Derivate bildet das von EISLEB und SCHAUMANN (1939) eingeführte Dolantin, ein Aminobenzoesäureester des Piperidinoäthanols. Hier sind lokalanästhetische und morphinähnliche zentrale Eigenschaften stark ausgesprochen. Bezüglich dieser Verbindung ist SCHAUMANN (1940), auf umfangreiche Tierversuche gestützt, der Ansicht, sie besitze eine komplexe muskuloneurotropic spasmolytische Wirkung auf glatte Muskulatur.

Versuche, die Tropasäure an Aminoalkohole zu binden, wurden von FROMHERZ (1933) vorgenommen, der eine Reihe Verbindungen der Tropasäure mit aliphatischen Aminoalkoholen darstellte. Von diesen wies namentlich ein Derivat, ein Phosphat des Diäthylaminodimethylpropanolesters der Tropasäure, solche Eigenschaften auf, dass es unter der Bezeichnung Syntropan als Spasmolyticum eingeführt wurde. Das Mittel besitzt laut Angabe eine muskuläre (papaverinanaloge) spasmolytische Wirkung, welche im Vergleich zu den anticholinergischen Eigenschaften dominiert.

Schliesslich wurde die Ähnlichkeit mit dem Atropinmolekül von MEIER (1936) in einem Mittel recht radikal ausgemerzt, bei welchem Änderungen im sowohl sauren wie basischen Teil des Moleküls vorgenommen worden waren. Die Substanz ist ein Hexahydrodiphenylazetyldiäthylaminoäthanol und hat angeblich ebenfalls eine muskuläre Direktwirkung, wodurch sie einen Übergang zu den Pharmaka der Papaveringruppe bildet. Das Medikament hiess ursprünglich Trasentin.

In den allerletzten Jahren sind atropinähnliche Wirkungen gewissen Xanthinderivaten zugeschrieben worden, z. B. dem Theophyllinmonoäthanolamin, welches, wie EMMELIN, KAHLSON und LINDSTRÖM (1941) nachgewiesen haben, einen derartigen Effekt auf glatte Muskulatur hat.

Allem Anschein nach besitzen auch gewisse Barbitursäurederivate einigermassen anticholinergische Eigenschaften. Dass Evipan die Okulomotoriusfunktion im anticholinergischen Sinne beeinflusst, ist vor kurzem von EMMELIN (1941) gezeigt worden.

### 3. Kapitel.

## Prüfung der verwendeten Substanzen. Herstellung und Haltbarkeit von Lösungen.

Bei einer Untersuchung der vorliegenden Art sind selbstverständlich Reinheitsgrad und reproduzierbare Wirkung der verwendeten Drogen von ausschlaggebender Bedeutung. Dies ist bei früheren Untersuchungen über quantitative Wirkungen der Atropinderivate nicht immer beachtet worden, was zum Teil wahrscheinlich die einander widersprechenden und schwer zu beurteilenden Resultate erklärt. Es gibt ein umfangreiches Schrifttum über Löslichkeitsverhältnisse, Thermostabilität, Haltbarkeit in Lösung etc. anticholinergischer Pharmaka. Im allgemeinen wird angegeben, dass die Alkaloide sich in Wasser schlechter lösen als die Salze derselben, welche in weit grösserem Ausmass als die reinen Alkaloide in praktischem Gebrauch sind.

Bei den vorliegenden Untersuchungen gelangten möglichst reine Zubereitungen von Alkaloidsalzen zur Verwendung, mit Ausnahme des l-Hyoscyamins, welches in reiner, kristallinischer Alkaloidform angewendet wurde. Diese Substanz wurde, ebenso wie Atropinsulfat und Skopolaminhydrobromid, in reinster Form von deutschen Fabriken bezogen. Atropinmethylnitrat, Homatropinmethylnitrat und Atropin-N-Oxydhydrochlorid wurden von denjenigen Fabriken geliefert, welche zuerst in grosser Skala die Herstellung dieser synthetischen Mittel aufgenommen hatten. Das gleiche gilt für Apotropin, Syntropan und Euphthalmin. Dolantin, Trasentin, Theophyllinmonoäthanolamin und Evipan wurden in Gestalt des handelsüblichen Ampullenpräparats verwendet. Dasselbe war beim Histamin der Fall. Die Pilokarpinhydrochloridlösung wurde monatlich von dem Präparat der schwedischen Pharmakopoe Neubereitet.

Entscheidend für die biologische Aktivität des l-Hyoseyamins ist dessen spezifische Drehung polarisierten Lichts. Die Angaben über die maximale spezifische Drehung dieser Substanz schwanken recht erheblich. Dies hängt mit der Schwierigkeit zusammen, reine Zubereitungen zu erhalten, und die Zerstörung der äusserst labilen Substanz durch Verseifung in Lösung zu verhindern. Nach PFANKUCH (1939) dürfte das l-Hyoseyamin tatsächlich bis dahin nie in reiner Form dargestellt worden sein. Nach demselben Autor liegt die spezifische Drehung der Substanz zwischen  $-20^\circ$  und  $-22^\circ$ , höchstens  $-25,8^\circ$ . KÜSSNER (1938), welcher bei Merek mit der Darstellung reiner Belladonnaalkaloide gearbeitet hat, betont, dass, wie auch KUHN und SCHÄFER (1938) früher nachgewiesen hatten, die spezifische Drehung des l-Hyoseyamins in Äthanollösung in hohem Grade mit dem Wassergehalt variiert, welcher sich stets schwer konstant halten lässt. Nach GADAMER (1901) wird l-Hyoseyamin beim Stehen in Äthanollösung spontan racemisiert. KÜSSNER (1938) empfiehlt Chloroform als Vehikel bei der Bestimmung der spezifischen Drehung des l-Hyoseyamins und fand mit dieser Methode, dass das Mereksche Purissimumpräparat einen Wert von  $-25,2^\circ$  ( $c = 2$ ) ergab.

Das Atropinsulfat ist in seiner Eigenschaft als Razemat optisch inaktiv. Das gleiche gilt für Homatropinhydrobromid.

Skopolamin, welches linksdrehend ist, hat nach Angabe von PFANKUCH (1939) in reinem Zustand den Drehungswert  $-28^\circ$ . Das wasserfreie Skopolaminhydrobromid hat nach PFANKUCH in 5%iger wässriger Lösung einen Wert von  $-24,75^\circ$ . Die schwedische Pharmakopoe verlangt bei der offizinellen Substanz  $-25^\circ$ .

Die übrigen bei dieser Untersuchung geprüften anticholinergischen Substanzen sind ihrer biologischen Aktivität nach von optischen Eigenschaften unabhängig. Unten wird in Tabellenform die spezifische Drehung bei den hier verwendeten Alkaloiden angegeben, hinsichtlich welcher die Feststellung derselben von Bedeutung ist. Die Bestimmungen sind mittels des Lippichsehen Polarithmeters ausgeführt worden, das gegen ein Quarzprisma mit bekannter Brechung eingestellt wurde. Sämtliche angegebenen Zahlen sind mittlere Werte aus je 3 Bestimmungen mit geringer Streuung.

Tabelle 1.

Substanz	Lösungsmittel	Stärke der Lösung = c	Alter der Lösung	Spez. Drehung ( $\alpha_D$ ) 20°
l-Hyoseyamin	Chloroform	2 %	frisch bereitet	— 24,65°
l-Hyoseyamin	Chloroform	2 %	ein Monat	— 24,42°
l-Hyoseyamin	Äthanol 96 %	1 %	frisch bereitet	— 22,00°
l-Hyoseyamin	Äthanol 96 %	1 %	ein Monat	— 16,52°
Atropinsulfat	Äthanol 96 %	2 %	frisch bereitet	± 0,00°
Skopolamin- hydrobromid	Aq. dest.	5 %	frisch bereitet	— 25,06°

Wie sich aus der Tabelle ergibt, hat das l-Hyoseyamin in Chloroform gelöst im Einklang zu den oben wiedergegebenen Erfahrungen einen höheren Drehungswert als bei Lösung in Äthanol, und die erstere Lösung veränderte sich bei einmonatiger Aufbewahrung im Gegensatz zur letzteren nicht nennenswert.

Die Beobachtungen machen ferner ersichtlich, dass die verwendeten Zubereitungen von l-Hyoseyamin, Atropinsulfat und Skopolaminhydrobromid unter optischem Gesichtspunkt einen hohen Reinheitsgrad aufweisen. Der Wert für das l-Hyoseyamin beträgt ea. 96 % des von KÜSSNER gefundenen. Auch die spontane Raze-misierung in Äthanollösung, über welche oben berichtet worden ist, kommt deutlich zum Vorschein. Das Skopolaminhydrobromid hat einen etwas höheren Wert als den von PFANKUCH (1939) angegebenen, und genügt auch den Anforderungen der schwedischen Pharmakopoe sehr wohl. Das Atropinsulfat ist optisch inaktiv.

Das etwaige Vorkommen von Verunreinigungen bei hier angewandten Substanzen wurde gemäss den Vorschriften der schwedischen Pharmakopoe geprüft, wobei sich Atropinsulfat, Homatropinhydrobromid und Skopolaminhydrobromid als einwandfrei erwiesen.

Die Frage der Haltbarkeit von anticholinergischen Substanzen in Lösung und ihrer Thermostabilität ist im Schrifttum eingehend erörtert worden. So haben hinsichtlich der Haltbarkeit des Atropinsulfats in Lösung OELKERS, RAETZ und RINTELEN (1932) nachgewiesen, dass eine schwach saure Lösung der Substanz während 48 Stunden bei 37° nicht nennenswert abgeschwächt wurde. Bei späteren Untersuchungen konnten indessen VINCKE und

OELKERS (1937) feststellen, dass z. B.  $\frac{1}{2}\%$ ige Lösungen bei Aufbewahrung in Zimmertemperatur während längerer Zeit eine merkbare Einbusse ihrer Wirkung erlitten (ca. 30 % in  $1\frac{1}{2}$  Jahren). Bei alkalischer Reaktion geht der Zerfall erheblich rascher vonstatten. Bezüglich unserer heutigen Anschauungen über die Thermostabilität des Atropinsulfats kann angeführt werden, dass sich dieselben u. a. auf Untersuchungen von JOACHIMOGLU (1915) gründen, der zeigte, dass die Sterilisierung einer Atropinsulfatlösung den mydriatischen Effekt derselben auf die Katzenpupille nicht zerstörte. In Übereinstimmung hiermit wird das Atropinsulfat heutzutage allgemein als ziemlich thermostabil bezeichnet. Dass jedoch nach wie vor gewisse Zweifel bestehen, geht aus den wechselnden Sterilisierungsvorschriften in den Pharmakopoen verschiedener Länder hervor. So gibt HUSS (1941) in einer zusammenfassenden Übersicht über diese Fragen an, dass die schwedische Pharmakopoe als Sterilisierung 1 Stunde bei  $80^{\circ}$  empfiehlt, die norwegische und dänische 1 Stunde bei  $100^{\circ}$ , die finnische  $\frac{1}{2}$  Stunde bei  $100^{\circ}$  und die englische 1 Stunde bei  $80^{\circ}$  in drei Etappen. Die von HUSS zitierten SCHLEMMER und TÖRBER (1938) geben das Atropin als thermostabil an, was ihrer Definition nach bedeutet, dass das Mittel in wässriger Lösung im Autoklaven bei  $120\text{--}125^{\circ}$  nicht mehr als 5 % seiner Aktivität einbüsst.

Das l-Hyoseyamin soll nach dem von HUSS zitierten Autor STRICH in Lösung unter aseptischen Kautelen mit Chloroform und N/500 HCl bei  $60^{\circ}$  zubereitet werden. Verf.s eigene Erfahrungen mit dem l-Hyoseyamin gehen dahin, dass dieses das unvergleichlich empfindlichste der hier geprüften Belladonnaalkaloide ist. Eine mit physiologischer Kochsalzlösung aseptisch bereitete, nicht sterilisierte 1%ige Lösung zeigte beim Stehen in Zimmertemperatur schon nach 1—2 Tagen eine beträchtliche Verminderung ihrer anfänglichen Stärke, als Antagonismus gegen durch Pilokarpin hervorgerufene Speichelsekretion beim Menschen gemessen. *Da sich nicht einmal saure Lösungen als sicher haltbar erwiesen, wurde das l-Hyoseyamin bei den vorliegenden Untersuchungen nur in absolut frischer Lösung verwendet.*

Auch in bezug auf die Thermostabilität der Lösungen von Homatropinhydrobromid scheint nach HUSS eine gewisse Unsicherheit zu herrschen. Die Arzneibücher verschiedener Länder



geben ziemlich allgemein 80° als Maximum an, während die Zeitvorschriften wechseln.

Das Skopolaminhydrobromid ist hinsichtlich seiner Thermostabilität ebenfalls verschieden beurteilt worden, soll aber laut neuerer dänischer Untersuchungen Behandlung im Autoklaven vertragen.

Beim Atropinmethylnitrat wird in der HUSSSchen Zusammenstellung durchweg aseptische Zubereitung und Sterilfiltrierung ohne Erwärmung empfohlen. Man hält die Lösung für nicht stabil bei Aufbewahrung. In gewissen klinischen Übersichtsdarstellungen über die Anwendung des Mittels bei infantilem Pylorospasmus, z. B. in der von DOBBS (1939), wird die wöchentliche Herstellung neuer Lösungen angeraten. In einem gewissen Gegensatz hierzu steht die Angabe von VINCKE und OELKERS (1937), dass sich die nahestehende Substanz Atropinmethylobromid in boratgepufferter Lösung als wesentlich stabiler als Atropinsulfat erwies.

Bei der Herstellung der bei vorliegender Untersuchung verwendeten Lösungen anticholinergischer Mittel wurden mit Ausnahme der, wie oben (S. 24) angegeben, in der handelsüblichen Ampullenform angewandten die angegebenen allgemeinen Erfahrungen berücksichtigt; ferner wurden, um unnötige Risiken in bezug auf die Sterilität der gebrauchten Lösungen zu vermeiden, diejenigen Stoffe, welche der allgemeinen Ansicht nach thermostabil sind, auf die unten in Tabellenform wiedergegebene Weise durch Erwärmen sterilisiert. Die angewandten Verfahren stimmten mit den in z. B. der Militärapotheke in Stockholm gebräuchlichen überein. Was dagegen Substanzen betrifft, über deren Thermostabilität keine Angaben existieren, oder wo diese allzusehr auseinandergehen, so wurden die Lösungen aseptisch hergestellt und ohne Erwärmung sterilfiltriert.

Bezüglich der Haltbarkeit so bereiteter Lösungen beim Aufbewahren ergaben die ausgeführten Kontrolluntersuchungen für sämtliche bis auf l-Hyoscyamin, dass in Zimmertemperatur 3 Monate lang aufbewahrte 1 ‰ige Lösungen in Sol. natr. chlorat. physiol. in keinem Fall eine sichere Herabsetzung ihrer Wirkungsstärke aufwiesen, als Antagonismus gegen von Pilokarpin beim Menschen hervorgerufene Speichelsekretion gemessen. Die Resultate dieser Kontrollen sind in den Speichelsekretionstabellen bei

Tabelle 2.

*Sterilisierungsverfahren bei der Herstellung von Lösungen.*

Substanz	Lösungsweise in physiol. NaCl	Sterilisierungsmethode
l-Hyoseyamin .....	aseptisch .....	keine Sterilisierung
Atropinsulfat .....	gewöhnlich .....	100° 1 Stunde
Skopolaminhydrobromid .....	gewöhnlich .....	120° ¼ Stunde
Homatropinhydrobromid .....	gewöhnlich .....	80° 2 Stunden
Atropinmethylnitrat .....	aseptisch .....	Sterilfiltrierung
Homatropinmethylnitrat .....	aseptisch .....	Sterilfiltrierung
Atropin-N-Oxydhydrochlorid .....	aseptisch .....	Sterilfiltrierung
Apoatropinhydrochlorid .....	aseptisch .....	Sterilfiltrierung
Syntropan .....	aseptisch .....	Sterilfiltrierung
Euphthalminhydrochlorid .....	aseptisch .....	Sterilfiltrierung

der Versuchsperson Ö. im Kapitel über die Speichelabsonderung zu finden. Trotz der somit dokumentierten Haltbarkeit sämtlicher Lösungen mit Ausnahme derjenigen des l-Hyoseyamins wurden zur Sicherheit im Lauf der Untersuchungen monatlich neue Lösungen hergestellt und in keinem Falle, ausser in den obenerwähnten Kontrollexperimenten, Lösungen verwendet, die älter waren als 30 Tage. Die Lösungen wurden ohne Ausnahme in alkalifreiem Glas aufbewahrt.

## 4. Kapitel.

# Beeinflussung der Speichelsekretion.

### A. Frühere Untersuchungen.

Die Kenntnis, dass der Saft der Tollkirsche Trockenheit der Mundhöhle bewirkt, gehört zu den alten Überlieferungen des Volkes. BINZ (1891) zitiert einen gewissen MATTHIOLUS, der im 16. Jahrhundert das Vergnügen schilderte, welches es bereitet, einem hungrigen Mitmenschen vor einer Mahlzeit einen Weinextrakt aus Belladonnawurzel vorzusetzen: „... es ist ein grosser Spass, wenn jemand diesen Wein hungrigen Schmarotzern beibringt, und diese nun, an reichlich besetztem Tische sitzend, ganz unfähig sind, von den Speisen zu sich zu nehmen”.

Die wissenschaftliche Ergründung dieser Erfahrungstatsache setzt mit KEUCHEL (1868) ein, welcher zeigte, dass die Ursache der Sekretionshemmung durch Atropin eine periphere war. K. zog aus seinen Untersuchungen ferner den Schluss, dass das Atropin seinen Angriffspunkt an den Nervenendigungen hätte, da nicht einmal die Reizung postganglionärer Fasern nach Atropinisierung irgendeinen Effekt hatte.

HEIDENHAIN (1872) behauptete, dass das Atropin indessen nicht alle den Speicheldrüsen auf nervösem Wege vermittelten Impulse zu hemmen vermag. So wies er nach, dass sich die durch Reizung der Sekretionsnerven ausgelöste Zunahme der Durchströmung der Drüse mit Blut durch Atropinisierung nicht verhindern liess. Da nach Atropinisierung der Effekt bei Reizung postganglionärer Fasern zu den Speicheldrüsen ausbleibt, und direkte Applikation von Atropin auf prä- und postganglionäre Fasern den Reizungseffekt nicht hemmen kann, folgerte LANGLEY (1898), dass das Atropin auf die Nervenendigungen im Effektororgan und nicht direkt auf die Drüsenzellen einwirkt. Da das Atropin im allgemeinen ein Antagonist des Pilokarpins ist, war L. ferner der Ansicht, dass Atropin beeinflusse eine zwischen Nervenendigung und

Drüsenzelle befindliche Substanz. Man beachte, dass diese Vermutung geäußert wurde, ehe die cholinergische Natur der parasympathischen Nerven bekannt war.

Bei Untersuchungen über die Beeinflussbarkeit der Speichelabsonderung mit anticholinergischen Mitteln hat das Pilokarpin als Reizmittel eine hervorragende Rolle gespielt. Seine starke Wirkung auf die Speichelsekretion und sein reproduzierbarer, spezifischer Antagonismus gegen die Atropinderivate sind hierbei entscheidend gewesen. Die ersten Erfahrungen über die speicheltreibende Kraft des Pilokarpins wurden von WEBER (1876) veröffentlicht. Der Antagonismus Pilokarpin-Atropin überhaupt hatte für das Studium cholinergischer Funktionen viel zu bedeuten, einmal hinsichtlich der Speichelabsonderung, sodann namentlich in bezug auf die Motilität des Darms (vgl. S. 15). Der Antagonismus gegen eine von Pilokarpin ausgelöste Speichelsekretion ist eine der besten Methoden zum Studium der quantitativen Wirkungen anticholinergischer Substanzen. Derartige Untersuchungen am Menschen scheinen indessen bisher nicht vorgenommen worden zu sein.

Da der Antagonismus Pilokarpin-Atropin mit Rücksicht auf die Speichelsekretion bei der vorliegenden Untersuchung Verwendung gefunden hat, sei hier auf die geschichtliche und die prinzipielle Seite der Frage etwas näher eingegangen.

Zunächst wurde angenommen, dass ein Antagonismus zwischen gewissen Substanzen bestände, welche den Parasympathicus reizen bzw. hemmen, aber dieser Antagonismus wurde nicht für reziprok gehalten. So hatte Geltung, dass Atropin zwar dem Effekt des Muskarins entgegenwirken könnte (z. B. dem von Muskarin hervorgerufenen Herzstillstand bei gewissen Weichtieren), die Möglichkeit eines Einflusses des Muskarins auf atropinisierte Organe aber wurde bestritten. Ein ähnlicher Standpunkt wird noch von STRAUB und MUÑOZ FERNANDEZ (1933) eingenommen. Diese machen, auf Erfahrungen bei Versuchen über die Darmmotilität an Meerschweinchen gestützt, geltend, dass der Antagonismus Pilokarpin-Atropin im allgemeinen praktisch nicht reziprok sei. Freilich könne man mit Atropin einen Pilokarpineffekt dämpfen oder aufheben. Das Umgekehrte trifft jedoch diesen Autoren nach nicht zu, indem das Pilokarpin nicht imstande ist, eine Atropin-

blockierung zu durchbrechen, wenn man nicht grössere Dosen anwendet, als für praktischen Gebrauch in Betracht kommen.

Die Annahme eines reziproken Antagonismus Pilokarpin-Atropin hat sich aber sonst im Schrifttum völlig durchgesetzt. In seinen klassischen Arbeiten gibt CUSHNY (1914) auf Grund von Versuchen über die antagonistische Wirkung auf die Speichelabsonderung bei Hund und Katze mit Bestimmtheit an, dass bei verschiedenen Versuchstieren eine konstante Menge Atropin erforderlich ist, um den Effekt einer konstanten Menge Pilokarpin aufzuheben. Der antagonistische Effekt weist seinem Grade nach keine Abweichungen bei verschiedenen Tierindividuen auf. Bei ein und demselben Versuchstier fand C. (1914) ein konstantes Verhältnis zwischen der speicheltreibenden Dosis Pilokarpin und der diese Sekretion hemmenden Atropinmenge, wie die absolute Menge der injizierten Substanzen auch verändert wurde. Ferner konstatierte er, dass gewisse Umstände für eine Bedeutung des Zeitfaktors sprachen. Wenn man eins der Alkaloide länger auf den Organismus einwirken liess, erwies sich der entsprechende Antagonist als weniger wirksam, als wenn beide Alkaloide gleichzeitig zugeführt wurden. Besonders deutlich fand C. diesen Sachverhalt bei steigenden Dosen. Man kann also sagen, dass für den Pilokarpin-Atropin-Antagonismus dieselben Grundregeln gelten, wie für andere antagonistische pharmakologische Funktionen. Das Resultat der Wirkung der Antagonisten ist eine Funktion von Giftaffinitäten, Mengen und Reaktionszeiten.

CUSHNY (1904, 1905, 1920) hat auch grundlegende vergleichende Untersuchungen über den Wirkungsgrad verschiedener anticholinergischer Substanzen als Pilokarpinantagonisten bei der Speichelsekretion im Tierversuch ausgeführt. Er verwendete Hunde und Katzen mit Submaxillarisfisteln. Zehn Minuten nach Injektion der hemmenden Substanz wurden 5 mg Pilokarpinnitrat gegeben und der Speichel in Fünfminutenperioden während 40 Minuten gesammelt. Dann wurden die Experimente mit wechselnden Dosen verschiedener Tropeine wiederholt, bis die Sekretionskurven einander in befriedigendem Grade ähnelten. C. fügt jedoch hinzu, dass seine Methode keine absolute Sicherheit gewährt; dass sie aber ziemlich konstante Resultate liefert, wird seiner Ansicht nach von der Tatsache bekräftigt, dass die Sekretionskurven bei

denselben Versuchstieren nach monatelangen Intervallen reproduzierbar waren. Die relative Stärke einiger untersuchter Atropinderivate, auf die freien Basen berechnet, gibt CUSHNY (1920) auf Grund von Speichelabsonderungsversuchen an Hunden, wie folgt an:

l-Hyoscyamin . . . . .	600
Methylatropin . . . . .	450
Atropin . . . . .	300
d-Hyoscyamin . . . . .	15
l-Homatropin . . . . .	14
dl-Homatropin . . . . .	10
d-Homatropin . . . . .	7
Phenylazetyltropin . . . . .	1
Benzoyltropin . . . . .	1

v. ISSEKUTZ (1917) verglich Atropin und Homatropin mit den quartären Basen derselben. An narkotisierten Kaninchen wurde die Speichelsekretion mit Pilocarpin in der Dosis 20 mg stimuliert. Die folgenden Dosen, auf kg Versuchstier bezogen, hemmten den Pilocarpineffekt völlig:

Atropinmethylnitrat . . . . .	0,5 mg
Atropin . . . . .	1,5—2,0 »
Homatropinmethylnitrat . . . . .	1,0—2,0 »
Homatropin . . . . .	8,0—8,4 »

## B. Eigene Untersuchungen.

### 1. Methodik.

Als Reizmittel für die Speichelsekretion wurde ohne Ausnahme Pilocarpinhydrochlorid, subkutan oder intravenös injiziert, verwendet. Lokale Applikation in der Mundhöhle von Nahrungstoffen oder sauren Säften, Säuren u. dgl. gibt zwar momentan eine starke Speichelabsonderung, aber meist in Form wenig reproduzierbarer Sekretionsstöße. Die Versuchspersonen waren gesunde, jüngere Männer von gewöhnlicher Körperkonstitution. Die Versuche wurden unter Standardbedingungen ausgeführt, d. h. in der Ruhe und bei nüchternem Magen, meistens am Morgen. Der Speichel aus der einen Ohrspeicheldrüse wurde quantitativ während einer bestimmten Zeit gesammelt. Diese Drüse weist nach

BABKIN (1926) beim Menschen in der Ruhe keine Sekretion auf. Diese Beobachtung konnte völlig bestätigt werden. Zwei verschiedene Versuchsreihen wurden angestellt. In der ersten wurden die anticholinergischen Substanzen 30 Minuten vor dem Pilokarpin subkutan injiziert und dann das Sekret in Fünfminutenperioden während 60 Minuten gesammelt. Der Grund dafür, dass das Intervall 30 Minuten gewählt wurde, wird unten im Zusammenhang mit dem Bericht über einige Versuche zwecks Klärung der Bedeutung des Zeitfaktors besprochen werden. In der zweiten Versuchsreihe, welche gewissermassen eine Umkehrung der ersten ist, wurde das Pilokarpin kontinuierlich durch intravenöse Dauertropfinfusion von heparinisierte physiologischer Kochsalzlösung mit Pilokarpinzusatz zugeführt, so dass sich eine konstante Speichelsekretion von gewünschter Intensität stundenlang aufrechterhalten liess. In diesen Versuchen wurden die anticholinergischen Mittel durch momentane intravenöse Injektion zugeführt.

In beiden Reihen wurde der Speichel aus der einen Ohrspeicheldrüse quantitativ gesammelt und gewogen, oder es wurde die Tropfenzahl bestimmt. Bei derselben Versuchsperson wurde stets die Drüse auf derselben Seite verwendet, da es nicht a priori als sicher angesehen werden kann, dass beide Drüsen eine exakt gleiche Grösse und Sekretionskapazität haben. Der Speichel wurde mittels eines von KRASNOGORSKI (1930) angegebenen Aggregats gesammelt. Dieses besteht aus einem schalenförmigen inneren Teil, welcher über dem Ductus Stenonianus angebracht wird, sowie aus einer äusseren zirkulären Rinne, die mit einem geringen Vakuum in Verbindung steht, welches das Aggregat an seinem Platz zu halten vermag. Diese Anordnung hat den Vorteil, dass keinerlei Saugwirkung auf die Drüse ausgeübt wird, deren Sekret durch ein Rohr aus der inneren, die Drüsenmündung bedeckenden Schale abfließt. Der Sekretionsdruck der Drüse und die Heberwirkung befördern den Speichel durch eine schmale Leitung aus graduierten Glasröhren mit Gummizwischenstücken in ein Sammelgefäss hinab, welches nach Belieben gewechselt werden kann. Eine nennenswerte Verdunstung aus dem Gefäss wird von einem Gummipfropfen verhindert, der ein Loch für das Speicheldrüse und einen anderen Kanal zum Druckausgleich hat. Bei einiger Übung lässt sich das Aggregat, welches aus Silber angefertigt ist, um Rei-

zung zu vermeiden, leicht auf der Drüsenmündung anbringen. Da proximal in der Vakuumentleitung ein kleines Stück Glasrohr eingeschaltet wird, kann eine etwaige falsche Lage des äusseren Saugkranzes über der Drüsenmündung dadurch frühzeitig entdeckt werden, dass Speichel in der Saugleitung sichtbar wird. Eine Saugwirkung von etwa 5—10 mm Hg genügt in der Regel, um den Apparat sicher zu fixieren.

In der ersten Versuchsserie wurde die Sekretion durchweg 60 Minuten lang verfolgt, meistens in Fünfminutenperioden. Eine Dosis von 1 mg Pilokarpinhydrochlorid pro 10 kg Körpergewicht löste bei den hier untersuchten Individuen eine Absonderung von 20—35 g während der ersten Stunde aus. Die Grösse der Sekretion ist bei diesen Versuchspersonen innerhalb gewisser Grenzen proportional zum Gewicht. Der überwiegende Teil der Sekretion erfolgt im Laufe der ersten 60 Minuten nach der Injektion. Eine typische Sekretionskurve wird in Fig. 1 wiedergegeben.

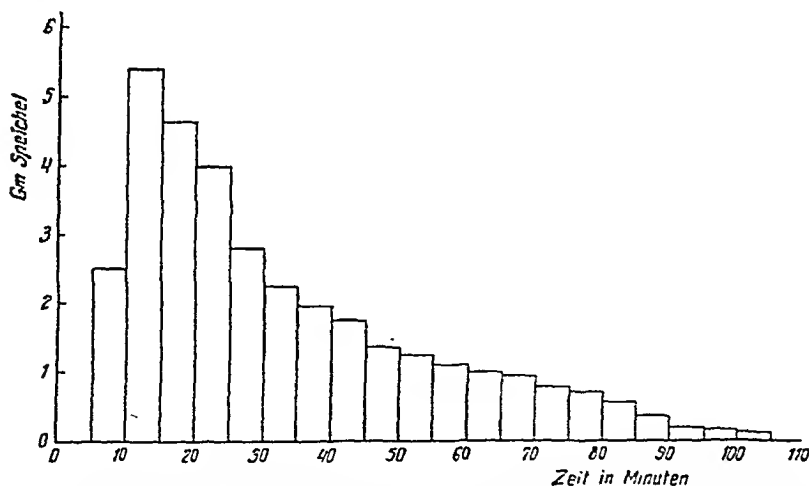


Fig. 1. Speichelsekretion der einen Parotisdrüse nach subkutaner Injektion von 1 mg Pilokarpinhydrochlorid pro 10 kg Körpergewicht bei Versuchsperson Ö.

Eine Voraussetzung für die Beurteilung des pilokarpinantagonistischen Effekts verschiedener hemmender Substanzen in Reihenversuchen ist natürlich, dass dieselbe Dosis Pilokarpin bei einer Versuchsperson unter Standardbedingungen bei mehrfacher Prüfung stets gleiche Sekretmengen bewirkt. Diese Vorbedingung



ist bei gesunden, jüngeren, männlichen Personen von gewöhnlicher Körperkonstitution zur Genüge erfüllt. Der Sachverhalt wird aus der folgenden Tabelle ersichtlich.

Tabelle 3.

*Von derselben Pilokarpinmenge an verschiedenen Zeitpunkten ausgelöste Speichelsekretion der linken Parotisdrüse bei Versuchsperson Ö.*

Zeit in Min. nach subkut. Inj. von 1 mg Pilokarpin-HCl pro 10 kg Körpergewicht	Zeitpunkt der verschiedenen Versuche und Sekretionsmengen in g in Zeitabsehnitten von je 5 Min.						
	5. IX. 41	7. IX. 41	10. IX. 41	29. IX. 41	12. X. 41	20. X. 41	15. XII. 41
1—5 . . . . .	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6—10 . . . . .	2,40	0,45	1,00	0,85	2,50	2,20	3,40
11—15 . . . . .	5,50	5,35	3,65	2,40	5,40	5,40	5,80
16—20 . . . . .	4,60	5,00	5,35	3,00	4,65	4,50	4,40
21—25 . . . . .	3,50	4,50	4,80	4,40	4,00	3,95	3,80
26—30 . . . . .	2,75	3,40	3,80	3,65	2,80	3,25	2,55
31—35 . . . . .	2,25	2,80	2,75	3,20	2,25	2,85	2,20
36—40 . . . . .	1,85	2,35	2,05	2,80	1,95	2,20	2,00
41—45 . . . . .	1,60	1,75	1,85	2,40	1,75	1,85	1,95
46—50 . . . . .	1,35	1,45	1,50	1,70	1,35	1,50	1,60
51—55 . . . . .	0,95	1,00	1,15	1,45	1,25	1,05	0,95
56—60 . . . . .	0,80	0,80	0,90	1,40	1,10	0,95	0,80
Summa	27,55	28,85	28,80	27,25	29,00	29,70	29,45

Mittel 28,60  $\pm$  0,45.

Aus der Tabelle geht hervor, dass eine befriedigend reproduzierbare Sekretion von Pilokarpin in der Dosis 1 mg pro 10 kg Körpergewicht an verschiedenen Zeitpunkten ausgelöst wird. Ferner lässt sich eine Gewöhnung nachweisbaren Grades an den Pilokarpineffekt nicht bemerken. Ebenso wenig ist irgendeine Reaktionsänderung zu finden, welche den während der Beobachtungszeit angewandten anticholinergischen Substanzen zugeschrieben werden könnte, jedenfalls keine derartigen Erscheinungen, wie die von ARIMA (1918) bei Tierversuchen nachgewiesene paradoxe Hypersalivation nach einer Zeitlang vorgenommener Atropinisierung.

Auch andere Einzelheiten in bezug auf den Sekretionsverlauf lassen sich aus der Tabelle entnehmen. Bei subkutaner Injektion

des Pilokarpins kommt die Sekretion regelmässig nach 5–10 Minuten in Gang. Die Injektionen wurden in der Regel an einem Arm vorgenommen. Bei einem Versuch, dem vierten, wurde die Einspritzung an dem einen Bein ausgeführt, wobei eine Phasenverschiebung der Sekretion zustande kam, welche diese Sekretionskurve von den übrigen in der Tabelle recht markant unterscheidet. Trotz der merkbar verzögerten Sekretion, welche schlechteren Resorptionsbedingungen für Pilokarpin im Bein gelegentlich des Versuchs zuzuschreiben ist, konnte die Sekretion während einer Stunde dieselbe Grössenklasse wie bei den übrigen Untersuchungsgelegenheiten erreichen. Hieraus geht hervor, dass etwaige Unregelmässigkeiten bei der Resorption des Pilokarpins, mit welchen man stets rechnen muss, recht wohl ausgeglichen werden können, wenn die Beobachtungszeit eine Stunde beträgt. Um jedoch eine möglichst gleichmässige Resorption zu sichern, wurde das Pilokarpin sonst stets auf einheitliche Weise in 1%iger Lösung in das subkutane Gewebe des einen Oberarms injiziert.

Eine die individuelle Sekretionsbereitschaft betreffende Beobachtung, welche eine gewisse Bedeutung für die Bearbeitung des Kurvenmaterials besitzt, wird am besten in diesem Zusammenhang besprochen. Es ergab sich, dass die Sekretmenge, mit welcher die untersuchten Individuen auf die Dosis 1 mg Pilokarpin pro 10 kg Körpergewicht reagierten, innerhalb gewisser Grenzen proportional zum Gewicht ist. In Tabellenform sieht dies folgendermassen aus:

Tabelle 4.

*Beziehung zwischen Speichelsekretion aus der einen Parotisdrüse in der ersten Stunde nach Injektion von 1 mg Pilokarpinhydrochlorid subkutan pro kg 10 Körpergewicht und Körpergewicht verschiedener Versuchspersonen.*

Versuchsperson	Körpergewicht in kg = P	Speichelsekretion in g pro Stunde = a	Anzahl Observationen	Relation a : P
S. ♂	60,0	23,15	1	0,39
B. ♂	64,0	24,80 ± 0,57	2	0,39
Ö. ♂	71,5	28,60 ± 0,45	7	0,40
E. ♂	77,0	33,70 ± 0,81	3	0,44
K. ♂	79,5	30,65	1	0,39

*Mittel = 0,40 ± 0,02.*

Die natürlichste Erklärung dieses Verhältnisses ist, dass die Grösse der Ohrspeicheldrüse proportional zum Körpergewicht ist. Die berechnete Beziehung zwischen Gewicht und Sekretion pro Zeiteinheit findet im folgenden Verwendung, wenn es sich um einen Vergleich der gedämpften Sekretionskurven der verschiedenen Versuchspersonen handelt. Der erhaltene Faktor  $0,4 \cdot P$  ermöglicht hierbei die Zurückführung der Kurven auf nahe beieinander liegende Ausgangspunkte.

Die zweite Versuchsreihe stellt, wie einleitend bereits erwähnt wurde, gewissermassen eine Umkehrung der ersten dar. Mit diesen Versuchen wurde beabsichtigt, den antagonistischen Verlauf zu untersuchen, nachdem der Zeitfaktor nach Möglichkeit eliminiert worden war. Zu diesem Zwecke wurde das Pilokarpin als kontinuierliche intravenöse Infusion und die anticholinergischen Mittel als momentane intravenöse Injektionen gegeben. Die Versuche wurden an zweien von den Versuchspersonen der ersten Reihe unter einheitlichen Standardbedingungen vorgenommen.

In der Absicht, eine konstante Sekretionsgeschwindigkeit des Speichels zu erzielen, wurde das Pilokarpin so zugeführt, dass eine konstante Blutkonzentration erreicht wurde. Dies ist möglich, wenn Zufuhr und Ausscheidung der Substanz sich die Waage halten, ein Zustand, welcher sich nur durch intravenöse Dauerinfusion herbeiführen lässt. Hinsichtlich der diesbezüglichen theoretischen Voraussetzungen wird auf TEORELL (1933) verwiesen. Das Pilokarpin wurde in einer Konzentration von  $0,02\%$  in einer heparinisierten physiologischen Kochsalzlösung infundiert, welche ohne Pilokarpinzusatz keine Speichelsekretion bewirkte. Die Heparinmenge betrug 20 mg pro 100 ml Infusionsflüssigkeit. Aus einer gewöhnlichen, 30 ml fassenden Bürette floss die Lösung durch einen dünnen Gummischlauch mit regulierbarer Schraubklemme und eine Kanüle (gewöhnliche Injektionsnadel Nr. 14) in eine Kubitalvene ein. Die Bürette wurde in konstanter Höhe über der Kubitalfalte der Versuchsperson angebracht. Die Frage der Bedeutung des Flüssigkeitsdrucks für die Infusionsgeschwindigkeit muss in diesem Zusammenhang mit einigen Worten berührt werden. In Modellversuchen konnte nachgewiesen werden, dass, wenn die Schraubklemme des Systems ganz offen gelassen wurde, der Druckunterschied in der Kanüle bei ganz- bzw. halbvoller

Bürette nur ca. 10 % ausmachte. Bei allmählicher Schliessung der Schraubklemme wurden, wie zu erwarten war, die Druckdifferenzen in der Kanüle bei wechselndem Füllungsgrad der Bürette rasch kleiner. Zur Sicherheit wurde die Bürette bei den Infusionsversuchen regelmässig nachgefüllt, wenn etwa 15 ml eingelaufen waren, weshalb eine nennenswerte Druckschwankung und durch diese verursachte Variationen der Infusionsgeschwindigkeit nicht befürchtet zu werden brauchten.

Bei den Versuchen wurde das Infusionstempo der 0,02%igen Pilokarpinlösung so abgepasst, dass die Pilokarpinkonzentration im Organismus kein Unbehagen in Form profusen Schweissausbruchs oder andere lästiger Nebenwirkungen hervorrief. Eine Infusionsgeschwindigkeit zwischen 0,5 und 0,8 ml pro Minute hatte bei den untersuchten Individuen eine Sekretionsgeschwindigkeit von 8—14 Tropfen pro Minute zur Folge. Die Sekretionsgeschwindigkeit wurde durch Tropfenzählung laufend kontrolliert. Das Tropfengewicht betrug bei dem angewandten Aggregat (demselben wie in der ersten Serie) 0,06 g. Zwischen dem Infusionstempo und der Sekretionsgeschwindigkeit liess sich eine lineare Beziehung feststellen. Diese wird von Fig. 2 veranschaulicht.

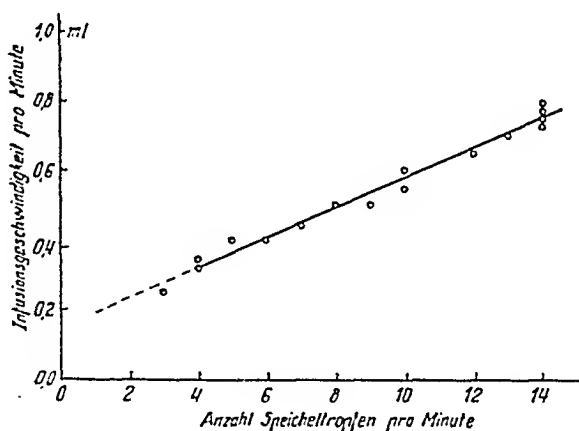


Fig. 2. Beziehung zwischen Infusionsgeschwindigkeit einer 0,02%igen Pilokarpinhydrochloridlösung und Speichelsekretionsgeschwindigkeit der einen Parotisdrüse bei den Versuchspersonen E. und Ö.

Die in den Versuchen verwendeten Sekretionsgeschwindigkeiten variierten zwischen 3 und 14 Tropfen pro Minute, was Speichelmengen zwischen 10,8 und 50,4 g pro Stunde entspricht. Dass

die grösste angewandte Sekretionsgeschwindigkeit, 14 Tropfen in der Minute, von der maximalen Kapazität der Drüse noch weit entfernt ist, geht daraus hervor, dass sich bei den Versuchspersonen ohne Schwierigkeiten über 30 Tropfen pro Minute erzielen liessen, wobei sich indessen gewisse subjektive Beschwerden einstellten.

Ein Vergleich zwischen den Sekretionsgeschwindigkeiten bei der ersten und zweiten Versuchsreihe zugleich mit einem solchen der Speichelausbeute bei subkutaner und intravenöser Pilokarpininjektion erscheint begründet. Bei subkutaner Applikation in der Dosis 1 mg pro 10 kg Körpergewicht rief das Pilokarpin bei der Versuchsperson Ö. (Tab. 3, S. 36) während der 3. Fünfminutenperiode die grösste Sekretionsgeschwindigkeit, bis gegen 6 g Speichel, hervor, was eine Durchschnittsgeschwindigkeit für den Abschnitt von etwa 20 Tropfen in der Minute bedeutet, also auch bei diesen Versuchen erheblich weniger als die maximale Geschwindigkeit. Um sich von der Sekretionsausbeute bei subkutaner Pilokarpininjektion im Vergleich zur intravenösen ein Bild zu machen, wird als Ausgangspunkt am besten ein Versuch gewählt, bei dem nach subkutaner Injektion der ganze Sekretionsverlauf verfolgt worden war. Einen derartigen Versuch findet man in graphischer Darstellung in Fig. 1 (S. 35). Bei diesem gaben 7,1 mg Pilokarpin subkutan insgesamt 33,8 g, davon 29,0 g während der ersten Stunde und den Rest, 4,8 g, während weiterer 50 Minuten. Dies entspricht einer durchschnittlichen Sekretion während der ganzen Zeit von 0,37 g pro Minute oder, in Tropfen von 0,06 g umgerechnet, 5,1 pro Minute. Wäre diese Sekretionsgeschwindigkeit konstant während 110 Minuten mittels intravenöser Dauerinfusion ausgelöst worden, so würden bei der betreffenden Versuchsperson (vgl. Fig. 2) 38,5 ml der 0,02%igen Pilokarpinlösung, 7,7 mg Pilokarpin enthaltend, verbraucht worden sein. Die Übereinstimmung kann als gut bezeichnet werden.

## 2. Resultate.

Die erste Versuchsreihe, die diejenigen Versuche enthält, bei welchen sowohl Pilokarpin wie anticholinergische Substanzen mit 30-Minuten Intervall zugeführt wurden, hatte den Zweck, das Pilokarpin in der konstanten Dosis 1 mg pro 10 kg Körpergewicht seine Aktivität gegen eine auf dem Höhepunkt

ihrer Wirkung stehende anticholinergische Hemmung der Parotisfunktion ausüben zu lassen. Den allgemeinen praktischen Erfahrungen nach vergeht etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde, bis eine subkutan zugeführte Atropindosis beim Menschen ihre Wirkungen voll entfaltet.

Um experimentell zu beleuchten, dass dies auch für den Pilocarpin-Atropin-Antagonismus in bezug auf die Speichelsekretion gilt, wurde eine Versuchsserie angestellt, in der das Zeitintervall zwischen den Injektionen der beiden Substanzen variiert wurde. Als hemmendes Mittel wurde Atropinsulfat in der Dosis 0,60 mg verwendet; dies vermag 30 Minuten nach subkutaner Injektion das Auftreten einer Parotissekretion nach 1 mg Pilocarpin HCl pro 10 kg Körpergewicht bei der betreffenden Versuchsperson gänzlich zu verhindern. Die Resultate sind in Tab. 5 zusammengestellt, aus der sich ergibt, dass das Atropinsulfat seine maximale Wirkung etwa 30 Minuten nach der Injektion auszuüben beginnt, ein Effekt, welcher schon 60 Minuten nach der Injektion deutlich abgenommen hat. Es besteht kein Grund zu der Annahme, dass die übrigen hier geprüften anticholinergischen Substanzen der Atropingruppe und diesen nahestehenden Mittel in dieser Hinsicht prinzipielle Abweichungen von Bedeutung aufweisen würden. Eine Andeutung grösserer Ausscheidungsgeschwindigkeit scheint doch in bezug auf die Mandelsäurederivate Homatropin und Homatropinmethylnitrat vorzuliegen. Hiervon wird später noch die Rede sein (S. 51).

Tabelle 5.

*Bedeutung des Zeitfaktors beim Atropin-Pilocarpin-Antagonismus in bezug auf die Speichelsekretion der einen Parotisdrüse bei Versuchsperson Ö.*

Atropinsulfat in $\gamma$ pro 10 kg Körper- gewicht. Subku- tane Injektion	Pilocarpinhydro- chlorid in mg pro 10 kg Körperge- wicht. Subkutane Injektion	Zeitabstand in Min. zwischen den Injek- tionen	Speichelsekretion in g während der ersten Stunde
84	1	0	4,20
84	1	15	1,85
84	1	30	0,00
84	1	60	1,45

Die erste Versuchsreihe enthält 5 Versuchspersonen. Für eine derselben, Ö., sind vollständige „Dämpfungs“-Kurven ausgeführt wurden, mit 4—10 verschiedenen Dosierungen für jede untersuchte Substanz von nennenswerter Aktivität. An den übrigen Versuchspersonen wurden einzelne Bestimmungen für jede Substanz vorgenommen, welche an meistens 3 verschiedenen Individuen geprüft wurde. Die von steigenden Dosen einer anticholinergischen Substanz verursachten Sekretionskurven bilden zusammen die vollständige „Dämpfungs“-Kurve der betreffenden Substanz. Die einzelnen Sekretionsverläufe bei zunehmender Hemmung weisen gewisse Charakteristika auf, welche von der hier folgenden, die Pilokarpinspeichelsekretion bei steigenden Dosen von Homatropinhydrobromid wiedergebenden Fig. 3 veranschaulicht werden.

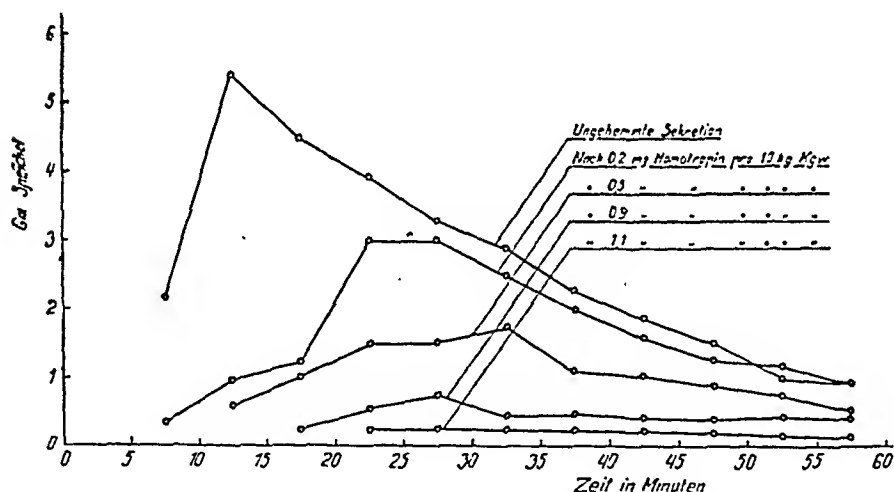


Fig. 3. Speichelsekretionskurven der einen Parotisdrüse bei Versuchsperson Ö. nach subkutaner Injektion von 1 mg Pilokarpinhydrochlorid pro 10 kg Körpergewicht und nach vorangehender Hemmung mit steigenden Dosen von Homatropinhydrobromid.

Man bemerkt zunächst, dass das Homatropin das Einsetzen der vom Pilokarpin verursachten Sekretion hinauschiebt. Diese Verzögerung nimmt bei steigenden Homatropindosen zu. Ferner wird die einzelne Sekretionskurve abgeflacht, um bei grossen Dosen des hemmenden Mittels einen fast horizontalen Verlauf anzunehmen. Einen ähnlichen Typ lassen diejenigen Sekretionskurven erkennen, welche unter dem Einfluss sonstiger anticho-

linergischer Substanzen erhalten worden sind. Ihre Wiedergabe an dieser Stelle würde zu viel Platz in Anspruch nehmen.

Sämtliche Versuchsergebnisse von den 5 Versuchspersonen der ersten Serie sind in Tab. 6 angegeben.

Tabelle 6.

*Die hemmende Wirkung verschiedener anticholinergischer Substanzen auf die von konstanten Pilokarpinhydrochloridmengen (1 mg pro 10 kg Körpergewicht) ausgelöste Speichelsekretion bei verschiedenen Versuchspersonen, deren ungehemmte Sekretion in Tabelle 3 angegeben ist.*

Versuchsperson	Substanz	Dosis in mg	Dosis in $\gamma$ pro 10 kg Kgw.	Sekretion in g pro Stunde
Ö.	Skopolaminhydrobromid .....	0,05	7	13,25
Ö.	Skopolaminhydrobromid .....	0,07	9	10,85
Ö.	Skopolaminhydrobromid .....	0,07	9	11,15
Ö.	Skopolaminhydrobromid .....	0,10	14	3,90
Ö.	Skopolaminhydrobromid .....	0,14	20	1,95
Ö.	Skopolaminhydrobromid .....	0,15	21	1,00
Ö.	Skopolaminhydrobromid .....	0,20	28	0,00
E.	Skopolaminhydrobromid .....	0,08	10	9,50
B.	Skopolaminhydrobromid .....	0,10	17	2,40
Ö.	Atropinmethylnitrat .....	0,05	7	14,95
Ö.	Atropinmethylnitrat .....	0,05	7	15,55
Ö.	Atropinmethylnitrat .....	0,07	10	12,15
Ö.	Atropinmethylnitrat .....	0,12	17	5,25
Ö.	Atropinmethylnitrat .....	0,20	28	1,60
Ö.	Atropinmethylnitrat .....	0,25	35	0,00
B.	Atropinmethylnitrat .....	0,15	23	2,85
E.	Atropinmethylnitrat .....	0,20	26	2,80
Ö.	l-Hyoscyamin .....	0,05	7	17,70
Ö.	l-Hyoscyamin .....	0,10	14	6,95
Ö.	l-Hyoscyamin .....	0,20	28	0,70
Ö.	l-Hyoscyamin .....	0,30	42	0,00
B.	l-Hyoscyamin .....	0,10	16	5,75
E.	l-Hyoscyamin .....	0,20	26	2,80
Ö.	Atropinsulfat .....	0,10	14	14,85
Ö.	Atropinsulfat .....	0,20	28	9,70
Ö.	Atropinsulfat .....	0,35	49	3,50
Ö.	Atropinsulfat .....	0,35	49	2,25
Ö.	Atropinsulfat .....	0,45	63	1,95
Ö.	Atropinsulfat .....	0,45	63	1,80
Ö.	Atropinsulfat .....	0,50	70	0,55
Ö.	Atropinsulfat .....	0,60	84	0,00

(Forts.)



Versuchs- person	S u b s t a n z	Dosis in mg	Dosis in $\gamma$ pro 10 kg Kgw.	Sekretion in g pro Stunde
E.	Atropinsulfat .....	0,20	26	10,10
B.	Atropinsulfat .....	0,40	62	1,40
K.	Atropinsulfat .....	0,50	63	1,65
Ö.	Atropin-N-Oxydhydrochl. ....	0,25	35	18,10
Ö.	Atropin-N-Oxydhydrochl. ....	0,60	84	10,85
Ö.	Atropin-N-Oxydhydrochl. ....	1,20	170	3,90
Ö.	Atropin-N-Oxydhydrochl. ....	1,20	170	3,55
Ö.	Atropin-N-Oxydhydrochl. ....	1,30	182	2,60
Ö.	Atropin-N-Oxydhydrochl. ....	1,50	210	1,00
Ö.	Atropin-N-Oxydhydrochl. ....	1,80	252	0,10
Ö.	Atropin-N-Oxydhydrochl. ....	2,00	280	0,00
B.	Atropin-N-Oxydhydrochl. ....	0,50	78	8,90
B.	Atropin-N-Oxydhydrochl. ....	1,50	234	0,10
S.	Atropin-N-Oxydhydrochl. ....	1,80	230	1,55
Ö.	Homatropinmethylnitrat .....	0,80	42	14,10
Ö.	Homatropinmethylnitrat .....	0,70	98	8,80
Ö.	Homatropinmethylnitrat .....	1,40	196	2,60
Ö.	Homatropinmethylnitrat .....	1,40	196	3,55
Ö.	Homatropinmethylnitrat .....	1,60	224	2,10
Ö.	Homatropinmethylnitrat .....	2,00	280	1,80
Ö.	Homatropinmethylnitrat .....	2,50	350	1,60
E.	Homatropinmethylnitrat .....	1,00	130	4,85
B.	Homatropinmethylnitrat .....	1,00	156	3,75
Ö.	Homatropinhydrobromid .....	0,70	98	23,55
Ö.	Homatropinhydrobromid .....	1,40	196	18,25
Ö.	Homatropinhydrobromid .....	2,10	294	16,55
Ö.	Homatropinhydrobromid .....	3,50	490	10,20
Ö.	Homatropinhydrobromid .....	3,50	490	11,85
Ö.	Homatropinhydrobromid .....	4,20	588	7,20
Ö.	Homatropinhydrobromid .....	6,30	882	5,80
Ö.	Homatropinhydrobromid .....	7,70	1 078	4,00
Ö.	Homatropinhydrobromid .....	9,80	1 372	3,05
Ö.	Homatropinhydrobromid .....	11,90	1 666	2,10
B.	Homatropinhydrobromid .....	2,00	312	11,70
E.	Homatropinhydrobromid .....	5,00	650	10,55
E.	Dolantin .....	50,00	6 500	17,80
B.	Dolantin .....	50,00	7 800	9,65
Ö.	Dolantin .....	70,00	9 800	10,45
Ö.	Euphthalminhydrochlorid .....	10,00	1 400	28,05
Ö.	Euphthalminhydrochlorid .....	25,00	3 500	19,15
Ö.	Euphthalminhydrochlorid .....	50,00	7 000	17,80
E.	Euphthalminhydrochlorid .....	50,00	6 500	17,25
B.	Euphthalminhydrochlorid .....	50,00	7 800	10,20

Versuchsperson	S u b s t a n z	Dosis in mg	Dosis in $\gamma$ pro 10 kg Kgw.	Sekretion in g pro Stunde
Ö.	Trasentin .....	50,00	7 000	21,00
B.	Trasentin .....	50,00	7 800	12,10
E.	Trasentin .....	120,00	15 600	8,85
Ö.	Apoatropinhydrochlorid .....	1,00	140	29,70
Ö.	Apoatropinhydrochlorid .....	2,00	280	29,50
Ö.	Apoatropinhydrochlorid .....	3,00	420	28,80
Ö.	Apoatropinhydrochlorid .....	5,00	700	28,25
Ö.	Apoatropinhydrochlorid .....	12,00	1 680	30,55
E.	Apoatropinhydrochlorid .....	10,00	1 300	33,15
Ö.	Syntropan .....	2,00	280	29,00
Ö.	Syntropan .....	10,00	1 400	27,00
Ö.	Syntropan .....	30,00	4 200	26,70
E.	Syntropan .....	100,00	13 000	34,80
Ö.	Theophyllinmonoäthanolamin ..	50,00	7 000	30,45
E.	Theophyllinmonoäthanolamin ..	50,00	6 500	35,50
Ö.	Papaverinhydrochlorid .....	60,00	8 400	29,45

Aus der Tabelle wird folgendes ersichtlich:

1. Verschiedene anticholinergisch wirkende Mittel zeigen regelmässig eine mit der Dosis steigende Hemmung der Pilokarpinspeichelsekretion.

2. Verschiedene anticholinergische Mittel lassen deutlich eine verschiedene Wirkungsstärke als Pilokarpinantagonisten in dem Sinne erkennen, dass man stark und weniger stark wirkende Substanzen mit Sicherheit unterscheiden kann.

3. Für aktive Anticholinergica gilt durchweg, dass diejenige Dosis, welche erforderlich ist, um die von der gewählten Pilokarpinmenge hervorgerufene Speichelsekretion zur Hälfte zu hemmen („Halbierungs-dosis“), nur einen kleinen Teil der zur kompletten Hemmung nötigen Menge („Inhibierungs-dosis“) ausmacht.

Bei graphischer Darstellung der gefundenen Beziehung zwischen der von Pilokarpin ausgelösten Speichelsekretion während der ersten Stunde nach der Pilokarpininjektion, in g pro Stunde ausgedrückt, ( $= y$ ), und der Dosis der anticholinergischen Substanz, in  $\gamma$  pro 10 kg Körpergewicht ausgedrückt, ( $= x$ ), wird am besten  $\log y$  als eine Funktion von  $x$  angegeben. Die Beziehungen für die bei Versuchsperson Ö. geprüften Substanzen sind in die Fig. 4, 5

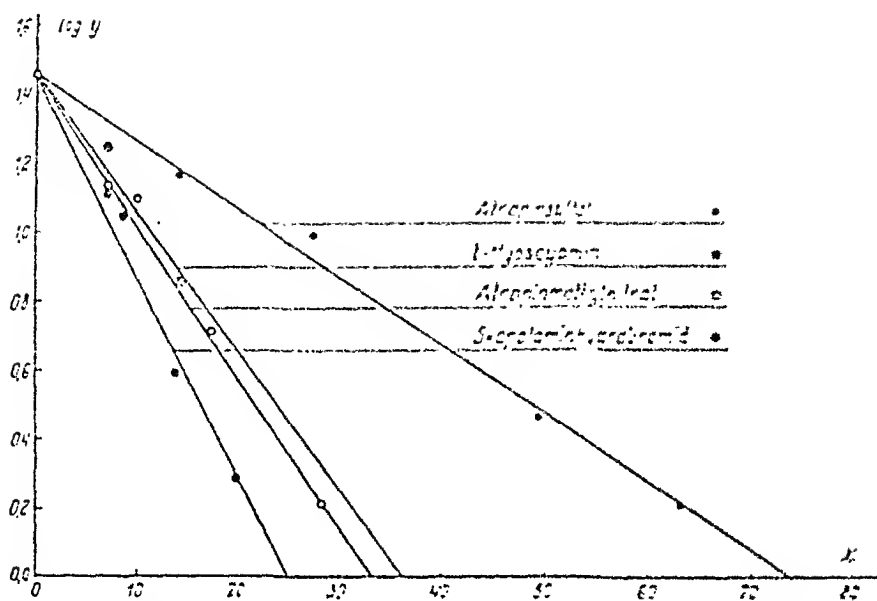


Fig. 4. K-Werte für Atropinsulfat, 1-Hyoseyamin, Atropinmethylnitrat und Skopolaminhydrobromid bei Versuchsperson Ö.

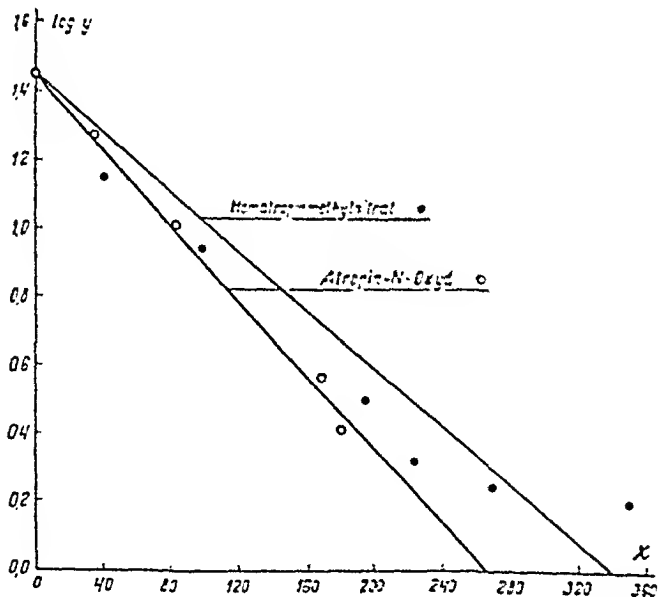


Fig. 5. K-Werte für Homatropinmethylnitrat und Atropin-N-Oxydhydrochlorid bei Versuchsperson Ö.

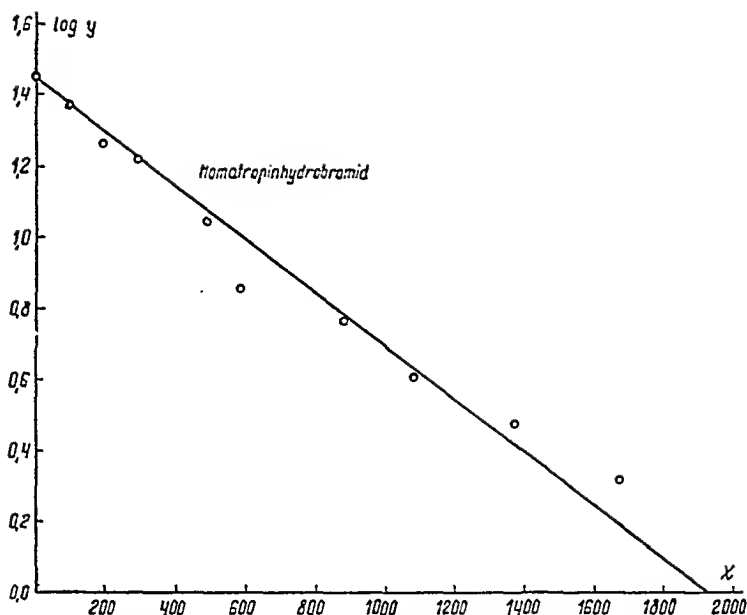


Fig. 6. K-Wert für Homatropinhydrobromid bei Versuchsperson Ö.

und 6' eingetragen, wo verschiedenen anticholinergischen Substanzen in Gruppen ihrer pilokarpinantagonistischen Stärke nach zusammengestellt sind.

Wie sich aus diesen Diagrammen ergibt, können die beobachteten Werte als auf geraden Linien liegend betrachtet werden. Die Lage derselben wurde mittels der Methode der kleinsten Quadrate berechnet, wobei jedoch vorausgesetzt wurde, dass sämtliche Linien von dem Punkt 1,456 auf der Ordinate ausgehen, welcher die vom Pilokarpin im Mittel hervorgerufene ungehemmte Speichelsekretion angibt.

Die Gleichung der geraden Linien ist von der Form  $\log y = 1 - kx$ , wobei  $1 = \log 28,6 = 1,456$  ist.

Nach der Methode der kleinsten Quadrate wird  $k$  durch die Beziehung  $u = \sum (1 - kx - \log y)^2 = \text{Min.}$  bestimmt, was eintritt, wenn  $\frac{\partial u}{\partial k} = 2 (-1 \sum x + k \sum x^2 + \sum x \log y) = 0$  ist;

$$\therefore k = \frac{1 \sum x - \sum x \log y}{\sum x^2}.$$

Bei Berechnung von  $k$  wurden die  $y$ -Werte unter 1 weggelassen, einmal da die physiologischen Verhältnisse innerhalb dieses Kur-

Tabelle 7.

*Der Hemmungsfaktor k bezüglich der Pilokarpinantagonismus bei sämtlichen Versuchspersonen.*

Versuchs- person	Ü.		E.		B.		S.		K.		Mittel
Substanz	k	Anzahl Obs.	k	Anzahl Obs.	k	Anzahl Obs.	k	Anzahl Obs.	k	Anzahl Obs.	
Skopolamin- hydrobromid	0,062	5	0,06	1	0,06	1	—	—	—	—	0,060
Atropinme- thylnitrat	0,048	5	0,04	1	0,05	1	—	—	—	—	0,044
l-Hyoscyamin	0,041	2	0,04	1	0,04	1	—	—	—	—	0,041
Atropinsulfat	0,020	6	0,02	1	0,02	1	—	—	0,02	1	0,020
Atropin-N- Oxydhydro- chlorid	0,0054	5	—	—	0,006	1	0,005	1	—	—	0,005
Homatropin- methylnitrat	0,0044	7	0,006	1	0,005	1	—	—	—	—	0,005
Homatropin- hydrobromid	0,00075	10	0,0007	1	0,001	1	—	—	—	—	0,0008
Dolantin	0,00006	1	0,00004	1	0,00005	1	—	—	—	—	0,00005
Euphthalmin- hydrochlorid	0,00009	2	0,00004	1	0,00005	1	—	—	—	—	0,00004
Trasentin	0,00002	1	0,00008	1	0,00004	—	—	—	—	—	0,00003
Syntropan	0,00001	3	0,00000	1	—	—	—	—	—	—	0,00001
Apöatropin- hydrochlorid	0,00000	4	0,00000	1	—	—	—	—	—	—	0,00000
Theophyllin- monoäthanol- amin	0,00000	1	0,00000	1	—	—	—	—	—	—	0,00000

vengebiets offenbar systematische Abweichungen bedingen, sodann weil schon kleine Veränderungen der  $y$ -Werte hier so grosse Variationen des  $\log y$  verursachen, dass die Resultate hierdurch verschoben werden würden.

Die Resultate der  $k$ -Bestimmungen nach der Methode der kleinsten Quadrate sind in der obigen Tabelle 7 zu finden, welche sämtliche Versuchspersonen enthält. Da die einzelnen  $k$ -Werte bei den Versuchspersonen B., E., S. und K. sich nicht von Be-

stimmungen ganzer Dämpfungskurven sondern aus Einzelbeobachtungen herleiten, deren  $k$ -Wert aus der Gleichung  $k = \frac{\log(0,4 P)}{x}$  bestimmt wurde (vgl. Fig. 4, 5 und 6), wobei  $x$  graphisch ermittelt ist, kann ihnen nicht dieselbe Genauigkeit zuerkannt werden wie den Werten bei der Versuchsperson Ö., weshalb weniger Dezimalen mitgenommen worden sind.

Um die pilokarpin antagonistische Stärke zweier verschiedener anticholinergischer Substanzen in Beziehung zueinander zu setzen, wird dieses Verhältnis als die Relation zwischen denjenigen Dosen definiert, welche bei jeder der Substanzen zur Erzielung einer gleichstarken Sekretionshemmung erforderlich sind.

Angenommen, die gehemmte, von Pilokarpin hervorgerufene Sekretion ist in beiden Fällen die gleiche, so folgt unmittelbar aus der Beziehung  $\log y = 1 - kx$ , dass  $1 - k_1 x_1 = 1 - k_2 x_2$  ist. Das Verhältnis zwischen den zur Erzielung desselben Hemmungsgrades nötigen Substanzmengen wird also  $x_1 : x_2 = k_2 : k_1$ . Da die Beziehung zwischen  $\log y$  und  $x$  eine lineare ist, erhält man dasselbe Verhältnis zwischen  $x_1$  und  $x_2$ , unabhängig vom Grade der Sekretionshemmung.

*Das Verhältnis zwischen den pilokarpin antagonistischen Effekten zweier Substanzen wird also durch den reziproken Wert des Verhältnisses zwischen den gefundenen  $k$ -Werten angegeben.*

Wird der pilokarpin antagonistische Effekt der verschiedenen geprüften Substanzen auf den des Atropinsulfats als der bekanntesten und in der Praxis am meisten angewandten der anticholinergischen Substanzen bezogen und die Stärke des Atropinsulfats hierbei mit 100 bezeichnet, so ergeben sich die Verhältniszahlen aus der Tabelle 8.

Um die Beziehung zwischen Speichelsekretion und erforderlicher Menge hemmender Substanzen fernerhin zu beleuchten, kann man die logarithmische Funktion  $y = 1 - kx$  in exponentialer Form schreiben. Es ist da zu beachten, dass  $1 = \log a$  ist, wobei  $a$  die ungehemmte von Pilokarpin ausgelöste Sekretion bedeutet. Es ist also  $\log y = \log a - kx$  oder  $\frac{\log y}{a} = -kx$ , woraus  $y = a \cdot 10^{-kx}$  oder gemäss Tab. 4 S. 37  $y = 0,4 \cdot P \cdot 10^{-kx}$  folgt.

Tabelle 8.

*Relative pilokarpinantagonistische Stärke der verschiedenen anticholinergischen Substanzen auf Atropinsulfat = 100 bezogen.*

Substanz	Relative Stärke
Skopolaminhydrobromid .....	300
Atropinmethylnitrat .....	220
l-Hyoscyamin .....	205
Atropinsulfat .....	100
Atropin-N-Oxydhydrochlorid .....	25
Homatropinmethylnitrat .....	25
Homatropinhydrobromid .....	4
Dolantin .....	0,25
Euphthalminhydrochlorid .....	0,20
Trasentin .....	0,15
Syntropan .....	0,05
Apoatropinhydrochlorid .....	0,00
Theophyllinmonoäthanolamin .....	0,00

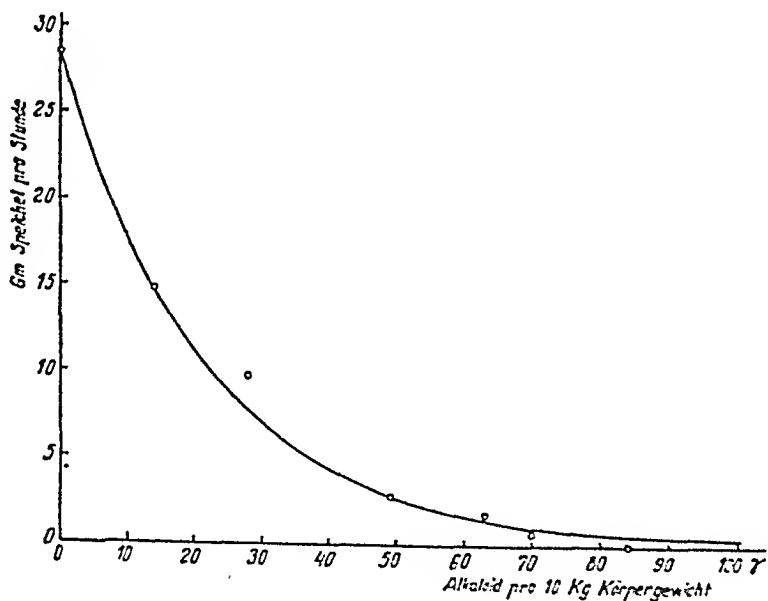


Fig. 7. Hemmende Wirkung auf die von Pilokarpinhydrochlorid (1 mg pro 10 kg Körpergewicht) ausgelöste Speichelsekretion von steigenden Dosen Atropinsulfat bei Versuchsperson Ü.

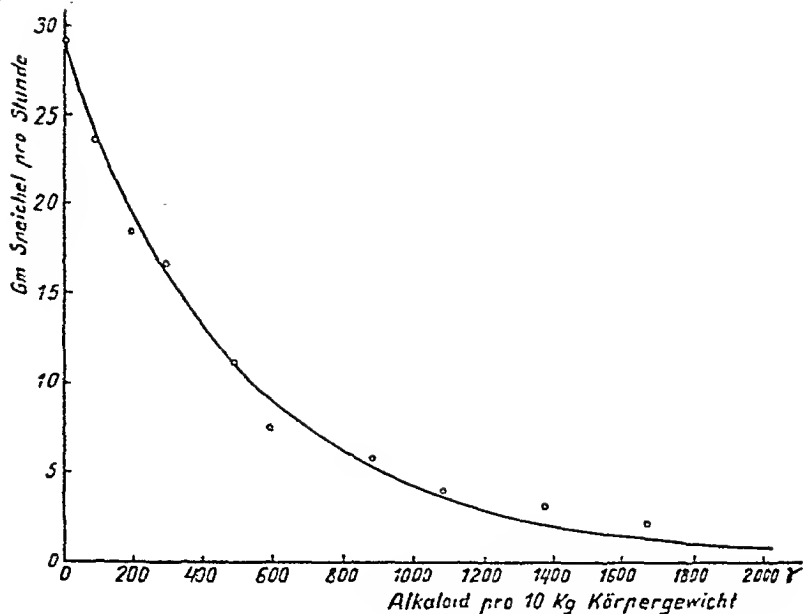


Fig 8. Hemmende Wirkung auf die von Pilocarpinhydrochlorid (1 mg pro 10 kg Körpergewicht) ausgelöste Speichelsekretion von steigenden Dosen Homatropinhydrobromid bei Versuchsperson Ö.

In Fig. 7 und 8 ist die Beziehung zwischen  $y$  und  $x$  bei der Versuchsperson Ö. für Atropinsulfat und Homatropinhydrobromid angegeben. Die Kurven geben jede für sich anscheinend systematischen Abweichungen von den theoretisch berechneten Kurven (ausgezogene Linien) Ausdruck. Diese Abweichungen machen sich in Dämpfungskurven mehrerer übriger Substanzen bemerkbar und bestehen bei Tropasäurederivaten in einer Tendenz zu vorzeitiger Näherung der  $y$ -Werte an die  $x$ -Achse am Ende der Kurve, während man bei Mandelsäurederivaten das Gegenteil finden kann.<sup>1</sup> Diese Erscheinungen sind am wahrscheinlichsten so zu erklären, dass bei hohen Dosen von Tropasäurederivaten die vom Pilocarpin theoretisch zu erwartende Sekretion deshalb nicht zum Vorschein kommt, weil die Schwellenkonzentration des Pilocarpins nicht erreicht wird. Hinsichtlich der Mandelsäurederivate, welche bei hohen Dosen relativ zu schwach zu sein scheinen, dürfte eine grössere Ausscheidungsgeschwindigkeit im Vergleich zu den Tropasäure-

<sup>1</sup> Dieser bei den Mandelsäurederivaten beobachtete „Überfluss“-Speichel hatte aber nicht die Eigenschaften eines Sympathikusspeichels.



derivaten die Erklärung dafür darstellen, dass das Pilokarpin hier leichter die Schwellenkonzentration erreicht.

Mit der zweiten Versuchsreihe wurde zunächst einmal ein Vergleich der hemmenden Wirkung ein und derselben Dosis einer anticholinergischen Substanz bei wechselnder Sekretionsgeschwindigkeit bezweckt, in der Absicht, die bei der ersten Versuchsserie gemachte Beobachtung zu bekräftigen, dass sich eine grössere Sekretionsgeschwindigkeit relativ leichter hemmen lässt als eine geringere. Ferner war ein Vergleich der pilokarpin antagonistischen Stärke verschiedener Anticholinergica unter möglichst weitgehender Ausschaltung des Zeitfaktors beabsichtigt.

Wie sich ergab, war es bei der angewandten Methodik sehr leicht, die Sekretionsgeschwindigkeit durch Änderung der Infusionsgeschwindigkeit der 0,02%igen Pilokarpinlösung zu variieren. Markante Änderungen der Infusion riefen bereits binnen wenigen Minuten deutliche Veränderungen der Sekretion gemäss der in Fig. 2 S. 39 angegebenen Beziehung hervor. Es machte auch keine Schwierigkeiten, während verhältnismässig langer Zeitabschnitte eine konstante Sekretionsgeschwindigkeit aufrechtzuerhalten. Dieser wurde nur von der Ermüdbarkeit der Drüse eine Grenze gezogen, welche sich bei mässigen Sekretionsgeschwindigkeiten erst nach Stunden geltend machte. Das Sekretionssystem erbot ferner eine ausgesprochene Empfindlichkeit gegen hemmende Einflüsse. Schon intravenöse Dosen von 0,01 mg aktiver Anticholinergica ergaben auch bei recht niedrigen Sekretionsgeschwindigkeiten ( $< 10$  Tropfen pro Minute) einen sicheren Effekt.

Die Wirkung von 0,02 mg Atropinsulfat bei verschiedenen Sekretionsgeschwindigkeiten wird von der hier folgenden Tabelle 9 illustriert, aus welcher hervorgeht, dass das Hemmungsvermögen des Atropins mit steigender Sekretionsgeschwindigkeit zunimmt, also in voller qualitativer Übereinstimmung mit den Resultaten der ersten Versuchsreihe.

Die intravenöse Methode hat indessen gewisse Mängel, welche die Bedeutung derselben für die vorliegenden Fragestellungen einschränken. So ist die Bestimmung des Zeitabschnitts, in welchem ein Quantum einer anticholinergischen Substanz seine hemmende Wirkung ausübt, mit einer grossen Fehlerquelle behaftet. Variationen von ein paar Minuten bringen grosse Verschiebungen der

Tabelle 9.

*Die hemmende Wirkung derselben Menge Atropinsulfat (0,02 mg intravenös) auf mit wechselnder Geschwindigkeit ausgelösten Speichelfluss nach intravenöser Dauerinfusion von 0,02%iger Pilokarpinhydrochloridlösung.*

Ver- suchs- person	Anfangs- geschwin- digkeit des Speichel- flusses in Tropfen pro Min.	Geringste Geschwin- digkeit des Speichel- flusses in Tropfen pro Min.	Dauer der Hemmung in Min.	Berechnete, unge- hemmte Sekretion in g	Gefundene Sokr. in g wäh- rend der Atropin- wirkung	Hemmung in %
Ö.	12	8	13	9,4	7,2	23
Ö.	9	6	13	7,0	5,7	19
Ö.	6	4	9	3,2	2,7	15
Ö.	4	3	4	0,9	0,8	12
Ö.	3	3	—	—	—	0
E.	14	10	8	6,7	5,5	19
E.	4	4	—	—	—	0

Resultate mit sich, wie es sich leicht an Hand der Tabelle abschätzen lässt. Da die Sekretion nach Abklingen der Hemmung kontinuierlich bis zum initialen Wert zurückgeht, ist leicht einzusehen, wie schwer es sein muss, mit Sicherheit zu bestimmen, wann die Wirkung der Hemmung ganz aufgehört hat. Dies gilt um so mehr, als das nicht bedeutet, dass die hemmende Substanz völlig eliminiert ist, sondern nur, dass dieselbe dermassen abgeschwächt worden ist, dass ihre Wirkung den vollen Effekt des Pilokarpins nicht länger hindern kann. Mit diesem Umstand hängt ein anderer Übelstand zusammen, nämlich die Unmöglichkeit, sicher zu entscheiden, wann eine neue Dosis hemmender Substanz injiziert werden kann, ohne dass man eine Summierung mit den Resten einer vorangehenden Injektion von anticholinergischer Substanz zu befürchten hat. Wollte man allen diesbezüglichen Einwänden begegnen, so dürfte man bei jedem Versuch nur eine Injektion vornehmen. Dies würde indessen grosse praktische Nachteile mit sich bringen, wenn Versuche am Menschen und ein Vergleich einer grossen Anzahl Substanzen in Betracht kommen. Bei den vorliegenden Versuchen wurde in der Regel, wenn es sich um Dosen von 0,02 mg hemmender Substanz handelte, zwischen zwei

Injektionen eine Pause gemacht, deren untere Grenze 20 Minuten war, und die oft wesentlich länger dauerte. In Tab. 10 sind einige Werte von Vergleichen zwischen etlichen aktiveren Derivaten angegeben. Die Stärkeverhältnisse zwischen diesen, Atropinsulfat, Atropinmethylnitrat und Skopolaminhydrobromid, welche in der ersten Versuchsreihe mit ca. 1 : 2,2 : 3 festgestellt worden waren, sind hier offenbar etwa 1 : 1,6 : 2,3. Gleichzeitig wird die Reproduzierbarkeit der Hemmung bei derselben Versuchsperson an verschiedenen Zeitpunkten veranschaulicht.

Tabelle 10.

*Die hemmende Wirkung verschiedener anticholinergischer Substanzen auf durch intravenöse Dauerinfusion 0,02%iger Pilokarpinhydrochloridlösung ausgelösten Speichelfluss. Sämtliche hemmenden Mittel intravenös in Dosen von 0,02 mg.*

Ver- suchs- person	Anfangs- geschwin- digkeit des Speichel- flusses in Tropfen pro Min.	Hemmungs- mittel	Dauer der Hemmung in Min.	Berechn., unge- hemmte Sekretion in g	Gefundene Sekretion in g wäh- rend der Hem- mungs- wirkung	Hemmung in %
Ö.	14	Atropin- sulfat	17	14,3	12,6	12
Ö.	14		14	11,8	9,9	16
Ö.	14		11	9,2	8,0	13
E.	14		8	6,7	5,5	18
Ö.	12	Atropinme- thylnitrat	13	9,4	7,3	23
Ö.	12		14	10,1	7,5	26
Ö.	12		17	12,2	8,8	28
Ö.	12	Skopolamin- hydrobromid	19	16,7	9,6	31
E.	14		14	11,7	7,5	36

Mittlere Hemmung für Atropinsulfat ..... = 15 %  
 Mittlere Hemmung für Atropinmethylnitrat ..... = 26 %  
 Mittlere Hemmung für Skopolaminhydrobromid ..... = 34 %

### Zusammenfassung.

1. Der Antagonismus zwischen dem cholinergisch wirksamen Pilokarpin und verschiedenen anticholinergischen Substanzen wurde zur Bestimmung der relativen Stärkeverhältnisse bezüglich

der Wirkung einer Reihe derartiger Substanzen auf die Speichelsekretion beim Menschen methodisch ausgenützt.

2. Unter den gegebenen Voraussetzungen liegt eine direkte Proportionalität zwischen dem Körpergewicht des Individuums und der während der ersten Stunde nach der Pilokarpininjektion abgesonderten Speichelmenge vor. Die speicheltreibende Wirkung des Pilokarpins auf die Parotis der Versuchspersonen erweist sich als mit einer Streuung von weniger als 10 % reproduzierbar.

3. Es wird gezeigt, dass unter den gegebenen Voraussetzungen eine quantitative Beziehung von logarithmischem Aussehen zwischen der vom Pilokarpin hervorgerufenen Speichelsekretion und der durch Anticholinergica verursachten Hemmung besteht. Dies bedeutet, dass eine höhere Sekretionsgeschwindigkeit relativ leichter von Anticholinergica gedämpft wird als eine geringere. Die erforderliche Halbierungsdosis einer anticholinergischen Substanz ist wesentlich kleiner als die Hälfte der völlig hemmenden Dosis.

4. Als absolute Gewichtsbeziehung zwischen Pilokarpinhydrochlorid und Atropinsulfat hinsichtlich ihrer antagonistischen Wirkung auf die Speichelabsonderung beim Menschen ergibt sich unter den vorliegenden Bedingungen ca. 100:8, d. h. für vollständiges Gleichgewicht oder pharmakodynamische „Neutralisation“ ist eine ca. 12,5mal so grosse Gewichtsmenge von Pilokarpin erforderlich als von Atropin.

5. Die erhaltenen Resultate gestatten eine ziemlich genaue Graduierung der relativen Stärke verschiedener anticholinergischer Substanzen als Pilokarpinantagonisten bei der Speichelabsonderung. Infolge der Art der abgeleiteten mathematischen Beziehung lässt sich die Stärke einer anticholinergischen Substanz unbekannten Wirkungsgrades durch eine einzige Bestimmung feststellen. Der Hemmungsgrad ergibt sich aus einer Gleichung, in welcher derselbe der einzige unbekannte Faktor ist.

6. Die beobachteten Stärkeverhältnisse geben zur Ergänzung und Revision geltender Anschauungen in mehreren Punkten Anlass. So wird die pilokarpinantagonistische Stärke des Skopolaminhydrobromids als die dreifache des Atropinsulfats festgestellt.

Ein sicherer Begriff von dieser Relation hat früher nicht vorgelegen. Der aus theoretischen Gründen zu erwartende und in vorangehenden Untersuchungen nachgewiesene doppelte Atropineffekt des l-Hyoseyamins wird bestätigt. Es wird gezeigt, dass Atropinmethylnitrat (Eumydrin, Methatropin) ebenfalls doppelt so stark wie Atropinsulfat ist, während Atropin-N-Oxyd (Genatropin) und Homatropinmethylnitrat (Novatropin) nur  $\frac{1}{4}$  des pilokarpin antagonistischen Effekts des Atropinsulfats besitzen. Homatropinhydrobromid hat  $\frac{1}{25}$  der Atropinwirkung. Von sonstigen geprüften Substanzen weist keine eine höhere Relationszahl gegenüber Atropinsulfat als  $\frac{1}{400}$  auf, einige dagegen eine wesentlich geringere, wenn überhaupt sichere pilokarpinantagonistische Wirkung.

## 5. Kapitel.

### Beeinflussung der Lichtreaktion der Pupille.

#### A. Frühere Untersuchungen.

Die Kenntnis von der Pupillenwirkung der Belladonnapflanze lässt sich bis in die Antike zurückverfolgen, aber systematischere Untersuchungen begannen erst mit der Entdeckung des Atropins (1831). So hat DE RUITER (1853) nachgewiesen, dass Atropin durch die Hornhaut hindurch resorbiert werden kann. BERNSTEIN und DOGIEL (1866) stellten fest, dass Atropin die Wirkung von Oculomotoriusreizung auf den Pupillensphinkter verhindert, während VÖLKERS und HENSEN (1866) zeigten, dass Reizung der Nn. ciliares die Akkomodationsparese im atropinisierten Auge nicht aufzuheben vermochte. ADAMÜK (1870) konnte trotz Atropinisierung des Auges durch direkte Muskelreizung Sphinkterkontraktion auslösen, während die Reizung postganglionärer Fasern ohne Effekt auf die Pupille blieb. Was das sehr umfangreiche ältere einschlägige Schrifttum betrifft, wird im übrigen auf die erschöpfende Monographie von LEWIN und GUILLERY (1905) verwiesen.

Die ersten Versuche einer quantitativen Bestimmung des Atropineffekts und seines zeitlichen Ablaufs beim menschlichen Auge sind von FEDDERSEN (1884) unternommen worden. Zwei Tropfen einer 1 %igen Lösung (etwa 500  $\gamma$ ) gaben nach ca. 15 Minuten Mydriasis, maximal nach 30 Minuten. Die Akkomodationsparese begann nach ca. 30 Minuten aufzutreten und erreichte ihren Höhepunkt nach 90 Minuten. Die Mydriasis fing nach 3 Tagen an, abzunehmen und war nach 10–14 Tagen ganz verschwunden, während die Akkomodationslähmung nach einem Tage nachzulassen begann und nach 7–10 Tagen vorüber war. Eine wahrnehmbare Mydriasis wurde regelmässig von 0,2  $\gamma$ , in vereinzelten Fällen schon von 0,08  $\gamma$  ausgelöst. Zu einer angedeuteten Akkomodationsparese war eine Dosis von 1–3  $\gamma$  erforderlich.

In neuerer Zeit haben sich mit den quantitativen Verhältnissen bei der Atropinmydriasis u. a. KOPPANYI und LIEBERSON (1930) beschäftigt, welche bei der Katze nach 50  $\gamma$  pro kg Körpergewicht intravenös eine 4 Stunden anhaltende Mydriasis und eine solche von 24stündiger Dauer nach 500  $\gamma$  bei entsprechender Verabreichung beobachteten. Bei lokaler Applikation (intraokulärer Injektion) bewirkten 0,05  $\gamma$  4 Stunden und 1  $\gamma$  50 Stunden lang Mydriasis.

EHRENREICH und RIESENFELD (1921) fanden bei einer Untersuchung an Kindern, dass Atropin in der Konzentration 1:500 000 in 75 % der Fälle Mydriasis hervorrief, während die Konzentration 1:600 000 nur in der Hälfte der Fälle wirksam war. Hieraus wurde ein Grenzwert von 0,05  $\gamma$  für die mydriatische Wirkung des Atropins berechnet.

Was die Frage einer etwaigen initialen Reizung des Pupillensphinkters durch Atropin anlangt, so gibt es nach POOS (1927) keine sicheren Anhaltspunkte für eine derartige Annahme. Eben- sowenig wirken die gewöhnlichen Anticholinergica reizend auf den Pupillendilatator.

Eine Gewöhnung lässt sich bezüglich der Pupillenwirkung des Atropins nach v. ANREP (1880), CLOETTA (1911) und PULEWKA (1932) nicht nachweisen, was selbstverständlich bei vergleichenden Reihenuntersuchungen von Bedeutung ist.

Über die mydriatische Stärke verschiedener anticholinergischer Substanzen liegen eine Reihe Untersuchungen, grösstenteils ältere, vor. So fand CUSHNY (1904) am Katzenauge dasselbe Stärke- verhältnis zwischen l-Hyoseyamin und Atropin wie beim Pilo- karpin antagonistismus, oder 2:1.

GRUBE (1905) wies bei einer vergleichenden Untersuchung am menschlichen Auge nach, dass eine Mydriasis von  $\frac{1}{2}$  mm durch 1%ige Lösungen von Homatropin, Atropin und Eumydrin nach 6 bzw. 10 und 12 Minuten ausgelöst wurde, während die maximale Mydriasis bei den gleichen Lösungen eine Einwirkung von 31 bzw. 28 und 51 Minuten erforderte. Eine maximale Wirkung wurde während 3—4 bzw. 26 und 17 Stunden beobachtet. Der mydria- tische Effekt überhaupt liess sich bei den besagten Substanzen während 24 Stunden bzw. 5—7 und 2—3 Tagen feststellen. Zum Vergleich können Werte von ERBE (1903) angeführt werden, der

als die entsprechenden Zahlen  $2\frac{1}{2}$  bzw. 8 und 2 Tage angibt, mit-  
hin eine ziemlich gute Übereinstimmung.

Bei LEWIN und GUILLERY (1905), welche das ältere Schrift-  
tum eingehend referieren, finden wir auch gewisse Verhältnis-  
zahlen für verschiedene Mydriatica. Für Skopolamin wird eine  
rascher einsetzende, stärkere und schneller aufhörende Wirkung  
angegeben als für Atropin. Nach verschiedenen Quellen werden  
innerhalb weiter Grenzen schwankende Stärkeverhältnisse zwischen  
Atropin und Skopolamin zitiert, z. B. 2:5; 1:5; 1:8; 1:10. Vom  
Homatropin wird gesagt, dass die Verhältniszahl mit Bezug auf  
Atropin auch eine wechselnde sei, und zwar zwischen 1:50 und  
1:100. Beim Apotropin konnten LEWIN und GUILLERY (1905)  
keinen mydriatischen Effekt finden.

Die schwächsten Lösungen, welche bei örtlicher Applikation am  
Katzenauge Mydriasis bewirken, wurden von V. ISSEKUTZ (1918)  
für einige Substanzen wie folgt bestimmt:

Atropin . . . . .	0,0033 %
Eumydrin . . . . .	0,0033 %
Homatropin . . . . .	0,0200 %
Novatropin . . . . .	0,0075 %

In bezug auf die vielfach erörterte Bedeutung der Reaktion der  
Lösung eines Anticholinergicums für die Pupillenwirkung des-  
selben sei in diesem Zusammenhang daran erinnert, dass sich  
nach MOMMSEN (1927) Mydriasis bei Säuglingen am leichtesten  
mit alkalischen Atropinlösungen erzielen lässt, während GAL-  
LENGER (1930) geltend macht, dass der Effekt von Hyper- oder  
Hypotonie der Lösungen gefördert werden, und dass isotonische  
Lösungen am langsamsten diffundieren. MOMMSEN hält indessen  
den höheren Dissoziationsgrad in alkalischen Lösungen für die  
Ursache der stärkeren Wirkung derselben.

## B. Eigene Untersuchungen.

### 1. Methodik.

Die Wirkung einer mydriatischen Substanz kann auf zweierlei  
Art gemessen werden: entweder man stellt den Durchmesser oder  
die Fläche der Pupille unter reproduzierbaren Bedingungen fest,



oder man untersucht die Lichtreaktion quantitativ. Das erstere Verfahren erfordert, um genaue Werte zu liefern, dass die Pupille bei der Messung jedesmal eine konstante Grösse hat. Dies ist aber schwer zu bewerkstelligen, da jede unter dem Einfluss von Licht stehende Pupille eine Tendenz zu abwechselnden Kontraktionen und Dilatationen aufweist. Diese Fluktuationen, welche individuell und temporär schwanken, vereiteln oft ganz und gar eine Präzisionsmessung des Durchmesser. Nicht einmal bei Filmaufnahme des Pupillenspiels lässt sich dieser Übelstand vermeiden, da man nicht mit Sicherheit entscheiden kann, welcher Kontraktionsgrad wirklich eine Gleichgewichtslage im Verhältnis zur angewandten Lichtstärke verkörpert. Da ausserdem die notwendige Belichtung beim Kinematographieren eine intensive sein muss, wird die Neigung der Pupille zu spontanen Fluktuationen noch gesteigert. Je höher der Grad der Mydriasis ist, desto mehr tritt freilich dieses Pupillenspiel in den Hintergrund; es gehört aber eine recht erhebliche Erweiterung der Pupille dazu, es — im grossen ganzen — zum Aufhören zu bringen. Präliminäre Versuche, den quantitativen Effekt der Mydriaticen durch Messungen des Pupillendurchmessers zu ermitteln, haben Verf. davon überzeugt, dass dieser Weg sich zu Untersuchungen beim Menschen nicht eignet.

Die andere Methode besteht darin, dass man die Lichtreaktion untersucht. Bei Mydriasis zunehmenden Grades, d. h. bei Sphinkterparese, hat man a priori Veranlassung, eine gesetzmässig und sukzessive fortschreitende Herabsetzung der Lichtreaktion zu erwarten, welche die ganze Skala vom normalen Ansprechen auf Lichteinfall bis zur völligen Lichtstarre durchläuft.

Das Studium der Lichtreaktion der Pupille ist auf zwei verschiedene Weisen denkbar, welche grundsätzlich keinen Unterschied in sich bergen, sich aber unter messungstechnischem Gesichtspunkte etwas verschieden gestalten. Man kann einerseits die absolute Reizschwelle des Sphinkters feststellen, d. h. diejenige Lichtmenge bestimmen, welche bei verschiedenen Graden von Sphinkterlähmung erforderlich ist, um eine eben noch wahrnehmbare Reaktion auszulösen. Dies lässt sich jedoch aus praktischen Gründen kaum durchführen, da man mit so geringen Belichtungsintensitäten zu arbeiten gezwungen ist, dass die Beobachtung des Verlaufs in höchstem Grade erschwert wird.

Der zweite Weg beim Studium der Lichtreaktion der Pupille ist die Ermittlung der kleinsten Lichtdifferenzen, welche bei bereits belichteter Pupille zur Auslösung einer sichtbaren Lichtreaktion genügen. Hierbei wird vorausgesetzt, dass die zu beobachtende Lichtreaktion von solcher Grössenordnung und Reproduzierbarkeit sei, dass man mit Sicherheit sagen kann, sie weiche von den oben besprochenen spontanen Pupillenfluktuationen ab. Es ist mithin nicht die absolute Reizschwelle, welche auf diese Weise bestimmt wird, sondern eine Differenzschwelle. Das Verfahren ist von HESS (1915) eingeführt worden, welcher die Methode als „Feststellung der pupillomotorischen Unterschiedsempfindlichkeit“ bezeichnet (im folgenden abgekürzt: p. U. E.).

Zu diesem Zweck konstruierte HESS (1915) ein „Differentialpupillooskop“ genanntes Instrument; hinsichtlich näherer Einzelheiten desselben in bezug auf Theorie und Technik wird auf H. verwiesen. Hier sei nur über das Prinzip des Apparats angeführt, dass derselbe aus einer Lichtquelle (Nernstlampe) besteht, deren Licht durch ein Linsensystem gleichmässig über eine kreisrunde Fläche von einigen qcm verteilt wird. Zu dem Instrument gehört ausserdem ein Fernrohr zur Beobachtung des zu untersuchenden Auges. Zwischen dem Linsensystem der Lichtquelle und dem Auge sind einige Graugläser von verschiedener Lichtdurchlässigkeit angebracht. In der Nähe dieser Gläser sitzen zwei Keile, ebenfalls aus Grauglas, die ohne Undichtigkeit in den Strahlengang eingeschaltet werden können. Diese Keile sind gegeneinander verschiebbar und ermöglichen die Passage kontinuierlich variierender Lichtmengen. Dadurch, dass man das Auge zunächst durch eins der Graugläser belichtet und dann statt dessen die Keile in den Strahlengang einschaltet, lässt sich die Lichtstärke gerade so weit steigern, dass eine sichere Lichtreaktion zustande kommt.

Die Ausführung einer Einzelbestimmung der p. U. E. erfolgte hier auf folgende Weise: Der Abstand zwischen Fernrohrobjektiv und zu untersuchendem Auge wird auf genau 25 cm eingestellt, indem der Kopf der Versuchsperson durch Kinn- und Stirnstütze fixiert wird. Das Auge, an welchem keine Beobachtung ausgeführt werden soll, wird verdeckt, um konsensuelle Impulse zu vermeiden. Die Versuchspersonen sollen es unterlassen, zu akkomodieren, was ja unter dem Einfluss von Mydriatica erleichtert ist.

Bei vorliegender Untersuchung wurde routinemässig das Grauglas angewendet, welches in dem benützten Pupillooskop 8,3 % des Lichtes der Nernstlampe durchlässt. Dieses Glas wird zuerst in den Weg des Strahlenbündels eingeführt. Dann werden die Keile so verschoben, dass eine etwas grössere Lichtmenge als 8,3 % zur Pupille passiert. Dies tritt nach der empirischen Graduierung der verwendeten Keile dann ein, wenn die auf der Skala der Schraube abgelesene Lage derselben 50 ist, was einer durchgelassenen Lichtmenge von 9,25 % entspricht. Diese Belichtungsänderung löst bei einem normalen Auge regelmässig eine deutliche Lichtreaktion aus. Dann werden die Keile gegeneinander bis zu einer Lage verschoben, bei der eine kleinere Lichtmenge als 8,3 % passiert. Das ist bereits bei Keillage 49 der Fall, wo 8,11 % durchgelassen werden. Auch hier reagiert ein normales Auge beim Wechsel von den Keilen zum Grauglas mit einer Durchlässigkeit von 8,3 %. Eigentlich ist damit die normale p. U. E. nicht exakt bestimmt, aber durch zwei recht nahe aneinander gelegene Belichtungsintensitäten eingekreist. Die Graduierung des Instruments gestattet indessen keine nennenswert genauere Ablesung an der Keilskala; die hier mögliche hat sich jedoch als für den vorliegenden Zweck genügend erwiesen. Die Berechnung des zahlenmässigen Ausdrucks für die p. U. E. erfolgt in der Weise, dass der Quotient zwischen den Prozentsätzen der bei den beiden verschiedenen Keilstellungen durchgelassenen Lichtmenge ausgerechnet wird. In dem gewählten Beispiel am normalen Auge ist dieser  $8,11 : 9,25 = 0,88$ . Der Grund dafür, dass die p. U. E. als Quotient zwischen der geringeren und grösseren Belichtungsintensität und nicht als Differenz derselben angegeben wird, ist, dass sich die p. U. E. mit den absoluten Lichtmengen ändert. Da 0,88 der höchste Wert ist, dessen Ablesung die Graduierung des Instruments ohne weiteres gestattet, ergibt sich, dass eine gewisse Abweichung von der wirklichen Norm erhalten wird. Die Differenz zwischen 8,3 % und 9,25 % ist ja offensichtlich zu gross, da gleichzeitig eine sichere Lichtreaktion bei der kleineren Belichtungsdifferenz zwischen 8,11 % und 8,3 % ausgelöst wird. HESS und seine Anhänger geben zwar an, dass sich die Normalwerte für die p. U. E. bis zu 0,84 hinab erstrecken, zugleich wird aber betont, dass normale Augen in der Regel 1 bedeutend näher kommen, einem Wert, welcher jedoch selbstver-

ständig nie ganz erreicht werden kann: dies würde die Fähigkeit bedeuten, zwischen gleichgrossen Lichtnungen zu unterscheiden. Da mithin in dem gewählten Beispiel der gefundene Wert 0,88 nur eine scheinbare Genauigkeit besitzt und eher ein Ausdruck für die Graduierung des Instruments als für die wirkliche p. U. E. ist, die etwas höher liegt, wird im folgenden die p. U. E. nur mit einer Dezimale angegeben; aus praktischen Gründen fanden nämlich die Bestimmungen bei Untersuchungen an mydriatischen Augen durch Einstellung ganzer Keilskalenteile statt, was eine für vorliegenden Zweck hinreichende Genauigkeit bedeutet.

Bei den Untersuchungen an den mit verschiedenen Mydriatica behandelten Augen wurde in analoger Weise vorgegangen. Die p. U. E. wurde durch „Einkreisung“ von oben und unten mit sukzessiver Einstellung ganzer Keilskalenteile bestimmt. Der Quotient wurde an Hand der für die Keile festgestellten empirischen Tabelle durch Transformierung der beiden Keillagen, der oberen und der unteren, bei welchen noch eine sichere und bei dreimaligem Belichtungswechsel regelmässig beobachtete Lichtreaktion auftrat, in Prozent Licht berechnet.

Das Verfahren bei der Bestimmung des Wirkungsgrades der verschiedenen mydriatischen Substanzen war sonst folgendes: Die Versuche wurde an drei gesunden, jüngeren männlichen Versuchspersonen mit normaler Schärfe und ohne Refraktionsanomalien ausgeführt. Bei jeder Versuchsperson wurden beide Augen abwechselnd angewendet, nachdem zuerst deren identische Reaktion auf die gleiche Dosis ein und desselben Mydriaticums festgestellt worden war. Die Versuche wurden meistens morgens vorgenommen und mit einer Kontrolle der ungedämpften Lichtreaktion eingeleitet, bei der der Wert stets höher als 0,9 war. Dann wurden die mydriatischen Substanzen mittels einer Tropfenpipette in den Bindehautsack eingeträufelt. Das Tropfengewicht bei dieser war für physiologische Kochsalzlösung und nach Einfettung bestimmt worden, es betrug  $30 \pm 1,0$  mg. Die Dosis des Mydriaticums war durchweg in einem einzigen Tropfen enthalten, die Konzentration der Lösungen wurde dementsprechend gewählt. Infolge des kleinen Tropfenvolumens kam ein Überlaufen von Flüssigkeit über den Lidrand nie vor, nicht einmal bei reizenden Substanzen. Unmittelbar nach der Einträufelung, welche in die untere Bindehautfalte

erfolgte, wurde die Caruncula lacrimalis leicht während 1—2 Minuten evertiert und der Lacus lacrimalis durch Änderung der Kopfstellung in Höhenlage gebracht.

Die Möglichkeit, die Sphinkterparese durch subkutane oder intravenöse Injektionen der mydriatischen Substanzen hervorzurufen, ist in Erwägung gezogen worden; der grossen Dosen, namentlich der schwächer wirkenden Substanzen, wegen, welche hierbei nötig gewesen wären, wurde jedoch von einem derartigen Verfahren abgesehen. Die Erfahrungen bei den Untersuchungen der Speichelsekretion lehren nämlich, dass auch schwache Anticholinergica in grossen Dosen lästige Nebenwirkungen, insbesondere zerebraler Art, auslösen können.

In bezug auf die Diffusion von in den Konjunktivalsack eingebrachten Lösungen sei hier an die Angabe von GALLENGER (1930) erinnert, dass isotonische Lösungen am schnellsten diffundieren. Die hier verwendeten Mittel wurden in physiologischer Kochsalzlösung appliziert, welche leicht hypotonisch ist. Ein Grund, wesentliche Unterschiede der diesbezüglichen Eigenschaften der gebrauchten Lösungen anzunehmen, liegt nicht vor. Ferner spielt die Molekülgrösse bei der Diffusionsgeschwindigkeit eine gewisse Rolle. Auch in dieser Hinsicht bestehen keine Unterschiede, welchen grössere Bedeutung beigemessen werden könnte. Die Verdünnung ist ebenfalls für die Diffusion wichtig, indem konzentrierte Lösungen rascher diffundieren als schwächere. Bei der Verdünnung ist indessen nicht die ursprüngliche Lösungsstärke ausschlaggebend, sondern auch die im Bindehautsack vorhandene Flüssigkeitsmenge. Es hat sich nicht als möglich erwiesen, sich einen sicheren Begriff von der Quantität der letzteren zu machen, man dürfte aber zu der Annahme berechtigt sein, dass sie unter normalen Verhältnissen recht konstant ist. Reizende Substanzen bewirken in dieser Beziehung insofern eine Veränderung, als sie eine gesteigerte Tränensekretion hervorrufen, deren Folge eine weitere Verdünnung der Lösung und Verzögerung der Diffusion ist. Man kann also behaupten, dass der wichtigste Faktor, welcher die Diffusion von Lösungen verschiedener nichtreizender Mydriatica im Bindehautsack beeinflusst, die Konzentration der Lösungen ist. Dies geht auch aus den Versuchsprotokollen hervor, welche einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Stärke der Lösung und

dem Zeitpunkt für das Eintreten der maximalen Wirkung ersichtlich machen.

Die erste Messung der p. U. E. nach der Einträufelung verschiedener Mydriatica wurde in der Regel nach 20 Minuten vorgenommen, und die späteren Beobachtungen folgten dann in gleichem Abstand, bis die Wirkung den Gipfel überschritten hatte. Darauf wurde die etwaige Dauer der Mydriasis ermittelt. Eine deutlich bemerkbare Erweiterung der Pupille konnte gewöhnlich schon festgestellt werden, ehe die p. U. E. eine Abnahme aufwies, und die Mydriasis hielt auch regelmässig wesentlich länger an als die mittels der oben beschriebenen Methode nachgewiesene Herabsetzung der p. U. E.

Die Lichtstärke der Nernstlampe wurde vor und nach den Untersuchungen kontrolliert und unverändert befunden.

## *2. Resultate.*

Die Untersuchungen wurden mit einer Serie von Bestimmungen der p. U. E. bei zwei Versuchspersonen nach steigenden Mengen Atropinsulfat eingeleitet, in der Absicht, die Empfindlichkeit der Methode bei vorliegenden Fragestellungen zu ermitteln und die geeignetste Dosierung der Mydriatica festzustellen. Der Anfang wurde mit 0,3  $\gamma$  Atropinsulfat gemacht, einer Dosis, welche, wie sich ergab, eine geringe, aber völlig sichere Wirkung hatte. Schon bei 3  $\gamma$  war eine für die angewandte Lichtstärke absolute Lichtstarre erreicht. Die Beziehung zwischen p. U. E. und Dosis Atropinsulfat sowie der zeitliche Ablauf sind in der hier folgenden Tab. 11 wiedergegeben.

Die Tabelle lässt erkennen, dass bei gleichen Atropinsulfatdosen zwischen der p. U. E. der beiden Versuchspersonen eine gute Übereinstimmung besteht. Ferner wird ersichtlich, dass die Wirkung ein und derselben Dosis Atropinsulfat reproduzierbar ist, sowie dass ein bestimmtes Verhältnis zwischen der Dosis Atropinsulfat und dem Grad der minimalen p. U. E., d. h. der maximalen Sphinkterparese, waltet. Diese beiden Umstände sind notwendige Voraussetzungen für die Anwendbarkeit der Methode in diesem Zusammenhang. Die Gesamtdauer der Mydriasis ist, wie man sieht, zur Dosis in der Hauptsache direkt proportional. Die Réla-

Tabelle 11.

*Zusammenhang zwischen Atropinsulfatmenge und pupillomotorischer Unterschiedsempfindlichkeit bei normalen menschlichen Augen.*

Versuchsperson .	Atropinsulfat in $\gamma$	Minimale p. U. E.	Zeitpunkt nach Einträufelung des Atropins in Minuten	Etwaige Dauer der Mydriasis in Stunden
Ö.	0,3	0,8	80	2
N.	0,3	0,8	80	2
Ö.	0,5	0,6	120	5
N.	0,5	0,6	120	5
Ö.	1,0	0,3	120	10
N.	1,0	0,3	100	10
Ö.	1,0	0,3	140	10
N.	1,0	0,3	120	10
Ö.	2,0	0,2	140	20
N.	2,0	0,1	140	20
Ö.	3,0	0,0	80	30

tion zwischen der Dosis des Mydriaticums und der p. U. E. lässt Ähnlichkeit mit einem logarithmischen Verhältnis erkennen, welches von Fig. 9 besonders illustriert wird. Durch Extrapolieren gelangt man zu einem Schwellenwert für die Wirkung des Atropinsulfats auf die p. U. E. bei der betreffenden Versuchsperson. Mit der angewandten Methode liegt dieser bei etwa 0,1  $\gamma$ .

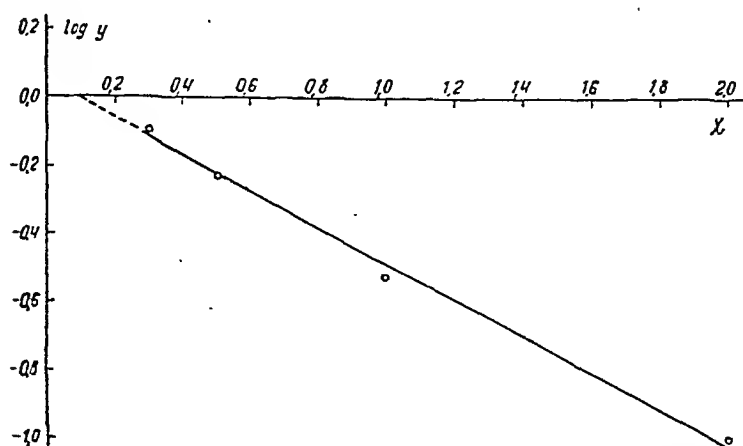


Fig. 9. Zusammenhang zwischen pupillomotorischer Unterschiedsempfindlichkeit (p. U. E.) und Menge Atropinsulfat bei Versuchsperson N.  $x = \gamma$  Atropinsulfat;  $y =$  p. U. E.

Bei der weiteren Untersuchung der mydriatischen Wirkung verschiedener anticholinergischer Substanzen wurde von der in dieser Weise für Atropinsulfat erhaltenen Eichkurve ausgegangen. Ferner diente der in bezug auf die Speichelsekretion nachgewiesene relative pilokarpinantagonistische Effekt als Richtschnur. Es erschien nämlich rationell und zeitsparend, alsbald die verschiedenen mydriatischen Substanzen in unter pilokarpinantagonistischem Gesichtspunkt äquivalenten Dosen zu prüfen. Etwaige Abweichungen von den Stärkerelationen derselben dürften sich unschwer beim Vergleich mit der Eichkurve des Atropinsulfats nachweisen lassen.

Ein Vergleich zwischen in diesem Sinne äquivalenten Mengen von Atropinsulfat, l-Hyosecyamin, Atropinmethylnitrat und Skopolaminhydrobromid ergab folgendes:

Tabelle 12.

*Wirkung auf die pupillomotorische Unterschiedsempfindlichkeit von bezüglich ihrer pilokarpinantagonistischen Stärke äquivalenten Mengen einiger stärkerer Mydriatika von anticholinergischer Natur bei Versuchsperson Ö.*

S u b s t a n z	Dosis in $\gamma$	Pupillomotorische Unterschiedsempfindlichkeit nach Minuten						
		20	40	60	80	100	120	140
Skopolaminhydrobromid	$\frac{1}{3}$	0,9	0,8	0,5	0,4	0,5	0,5	0,6
l-Hyosecyamin . . . . .	$\frac{1}{2}$	0,9	0,8	0,7	0,5	0,4	0,5	0,7
Atropinmethylnitrat . . .	$\frac{1}{2}$	0,9	0,8	0,7	0,5	0,5	0,5	0,7
Atropinsulfat . . . . .	1	0,9	0,9	0,8	0,5	0,4	0,3	0,4

Die hauptsächliche Übereinstimmung zwischen unter pilokarpinantagonistischem Gesichtspunkt äquivalenten Mengen der verschiedenen Substanzen ist augenfällig. Im Vergleich zu den bedeutenden Unterschieden, welche in der Eichkurve des Atropinsulfats für verschiedene Dosen registriert sind, können die angewandten Dosen der einzelnen Substanzen jedoch als in bezug auf die p. U. E. nicht ganz äquivalent bezeichnet werden. Dies bedeutet, dass für dieselben als Mydriatika nicht genau die gleiche relative Stärke gilt wie hinsichtlich ihres Pilokarpinantagonismus bei der Speichelabsonderung, oder, zahlenmässig ausgedrückt: Skopolaminhydro-



Tabelle 13.

*Wirkung verschiedener, hauptsächlich in bezug auf ihre pilokarpin-antagonistische Stärke äquivalenter Mengen von anticholinergischen Substanzen auf die pupillomotorische Unterschiedsempfindlichkeit (p. U. E.) des menschlichen Auges.*  
*Versuchspersonen Ö., N. und G.*

Substanz	Dosis in γ	Niedrigste Werte von p. U. E. bei Versuchsperson			Mittlere Zeit in Min nach Einträufelung	Mittlere Dauer der Mydriasis in Stunden etwa	Relative Wirkungs- stärke auf Atropin- sulfat = 100 be- zogen
		Ö.	N.	G.			
Skopolaminhydro- bromid .....	1/3	0,4	0,3	0,3	80	20	285
l-Hyoscyamin .....	1/2	0,4	0,4	0,4	120	10	160
Atropinmethylnitrat .	1/3	0,6	0,6	0,6	120	10	125
Atropinsulfat .....	1	0,3	0,3	0,3	120	10	100
Atropin-N- Oxyhydrochlorid .	4	0,8	0,7	—	40	3	8
Homatropinmethyl- nitrat .....	4	0,8	0,7	—	40	3	8
Homatropinhydro- bromid .....	25	0,6	0,6	—	40	5	2
Dolantin .....	400	0,8	0,7	—	20	2	0,08
Euphthalminhydro- chlorid .....	500	0,8	0,8	—	20	2	0,05
Evipannatrium .....	600	0,8	0,8	—	40	2	0,04
Syntropan* .....	1 500	0,6	0,6	—	40	2	0,03
Trasentin* .....	1 500	0,8	—	—	40	2	0,02
Apoatropinhydro- chlorid* .....	1 500	0,9	0,9	—	—	—	0,00
Theophyllinmono- äthanolamin .....	1 500	0,9	0,9	—	—	—	0,00

Die mit \* bezeichneten Substanzen bewirkten bei Einträufelung einen konjunktivalen Reiz, besonders stark das Trasentin.

bromid : l-Hyoscyamin : Atropinmethylnitrat : Atropinsulfat = ca.  
 2,9 : 1,6 : 1,3 : 1.

Die Prüfung sonstiger bei dieser Untersuchung angewandter anticholinergischer Mydriatica und Substanzen mit vermutlich gleichartiger Wirkung findet man in der oben eingefügten Tabelle 13, in der sämtliche Angaben Mittelwerte der Resultate bei den

Versuchspersonen sind. In keinem Falle ist die Differenz zwischen der niedrigsten p. U. E. der Versuchspersonen grösser als 0,1, in der Mehrzahl der Fälle ist die Übereinstimmung eine vollständige.

Die Zusammenstellung zeigt bei den stärkeren Mydriatica etwa dieselben Stärkeverhältnisse wie in bezug auf ihren pilokarpin-antagonistischen Effekt auf die Speichelsekretion. Bei den schwächeren Substanzen ist die Sachlage offenbar eine andere. Die Mandelsäurederivate weisen einen erheblich schwächeren relativen mydriatischen Effekt auf. Dasselbe gilt für Atropin-N-Oxyd. Auch Dolantin und Euphthalmin lassen das gleiche Verhalten erkennen. Apoatropin und Theophyllinmonoäthanolamin lassen sowohl nachweisbare mydriatische als auch nachweisbare pilokarpinantagonistische Eigenschaften bei der Speichelsekretion vermissen. Evipan, welches infolge seiner starken alkalischen Reaktion in Lösung nicht zur subkutanen Injektion bei Speichelabsonderungsversuchen verwendet werden kann, weist einen deutlichen mydriatischen Effekt auf.

Was die Dauer der mydriatischen Wirkung betrifft, so zeigt Skopolamin den höchsten Wert. Da es sich bei den Beobachtungen über die Dauer nur um ungefähre Feststellungen handelt, und zwar infolge der Schwierigkeit, sicher zu entscheiden, wann die Wirkung ganz aufgehört hat, können diese nicht den Gegenstand einer ins einzelne gehenden Bearbeitung mit dem Zweck abgeben, die Eliminationsgeschwindigkeit der betreffenden Substanzen zu bestimmen. Sehr instruktiv sind die Beobachtungen in bezug auf die Zeit bis zur Erreichung der maximalen Wirkung verschiedener Konzentrationen der Lösungen. Auch hier gestatten die nur alle 20 Minuten vorgenommenen Beobachtungen keine ins einzelne gehende Bearbeitung, aber die Tendenz zu rascher eintretender Wirkung bei steigender Lösungsstärke ist nicht zu verkennen.

### Zusammenfassung.

1. Die von anticholinergischen Substanzen hervorgerufene Parese des Pupillensphinkters beim Menschen wurde dazu verwertet, mittels des Differentialpupillokops von HESS die Stärkeverhältnisse verschiedener Mydriatica zu bestimmen.

2. Für Atropinsulfat wurde eine Eichkurve über die pupillomotorische Unterschiedsempfindlichkeit (p. U. E.) konstruiert, welche ein direktes Mass für die Sphinkterparese darstellt; dies gründet sich auf den Umstand, dass die Lichtreaktion mit steigender Sphinkterparese abnimmt. Es wird gezeigt, dass die Beziehung zwischen der Dosis Atropinsulfat und der p. U. E. einer logarithmischen Funktion gleicht. Die Schwellendosis wird bei einer der Versuchspersonen durch Extrapolieren zu etwa  $0,1 \mu$  Atropinsulfat bestimmt. Die Wirkung ein und derselben Atropinsulfatdosis ist mit grosser Genauigkeit reproduzierbar. Es wird nachgewiesen, dass die Wirkung einer bestimmten Menge Atropinsulfat in bezug auf ihre Dauer als Mydriaticum der Grösse der Dosis direkt proportional ist.

3. Der Zeitpunkt des Einsetzens der maximalen Wirkung eines Mydriaticums von anticholinergischer Art hängt, wie gezeigt wird, von der Konzentration der verwendeten Lösung derart ab, dass stärkere Lösungen rascher zu maximaler Wirkung führen als schwächere, und zwar unabhängig vom Wirkungsgrad des betreffenden Mittels.

4. Bei stärkeren Mydriatica ergeben sich dieselben ungefähren Stärkeverhältnisse wie zwischen ihrer pilokarpin antagonistischen Wirkung auf die Speichelsekretion beim Menschen, doch scheinen einige Abweichungen vorzuliegen. Die schwächer wirksamen Substanzen weisen in der Regel auch eine im Vergleich zum pilokarpin antagonistischen Effekt derselben relativ schwächere mydriatische Wirkung auf.

## 6. Kapitel.

# Beeinflussung des Minutenvolumens des Herzens, der Pulsfrequenz und des Blutdrucks.

### A. Frühere Untersuchungen.

Der zur Belladonnavergiftung gehörende beschleunigte Puls ist selbstverständlich schon früh beobachtet worden. In einer Beschreibung der Atropinwirkungen beim Menschen behaupteten v. SCHROFF, FRÖHLICH und LICHTENFELS (1862), das Atropin führe durch eine initiale Vagusreizung zu einem vorübergehenden Sinken der Pulsfrequenz. Erst später sollte die durch den Ausfall der Vagusbremse bedingte Frequenzsteigerung zum Vorschein kommen. Dieser vermutete initiale Reizeffekt hat von jenem Zeitpunkt an im Schrifttum eine grosse Rolle gespielt und ist abwechselnd bestätigt und bestritten worden. Demgegenüber waren alle darüber einig, dass hinreichende Atropindosen regelmässig die Herzfrequenz steigern. Hand in Hand mit dieser Beschleunigung geht eine Zunahme der Durchblutung der Kranzgefässe, was von REIN (1931) mittels der Thermostromuhr nachgewiesen worden ist. Die Atropinwirkung erstreckt sich auch auf den Blutdruck, welcher nach mehreren Beobachtern steigt. Bei grossen Dosen sind auch periphere Gefässerscheinungen zu bemerken, wovon unten des näheren die Rede sein wird.

v. BEZOLD und BLOEBAUM (1867), welche ebenfalls den oben-erwähnten initialen Reizeffekt des Atropins auf die Herzfrequenz im Tierversuch beobachten zu können glaubten, waren auch in der Lage, festzustellen, dass elektrische Vagusreizung bei atropinisierten Hunden die Herzfrequenz nicht länger herabzusetzen vermochte. Schon früh wurde gemäss den derzeitigen Ansichten über den Einfluss des Atropins auf andere parasympathische Funktionen angenommen, dass Nervenendigungen des Vagus den Angriffspunkt des Atropins darstellten.

Eine lange Reihe von Forschern verschiedener Zeiten scheinen auf dem Standpunkt zu stehen, dass das Atropin einen initialen Reizungseffekt auf den Vagus mit Herabsetzung der Herzfrequenz ausübt. So glaubten in neuerer Zeit u. a. STURGIS, WEARN und TOMPKINS (1919) beim Menschen nach einer Atropindosis von 1,2 mg subkutan eine initiale Pulsverlangsamung beobachten zu können. HARRIS (1921) gibt die Grenzdosis, bei der nach subkutaner Applikation der reizende Effekt noch in Erscheinung tritt, mit 1 mg an. Nach PASKIND (1921) soll sogar nach einer so grossen Atropindosis wie 2 mg die Zeit zur Unterseheidung des reizenden Effekts ausreichen, bevor sich die Vagushemmung entwickelt. Dies soll bei Europäern der Fall sein, während Neger in dieser Beziehung resistenter wären. PLATZ (1922) bezeichnet eine Dosis bis  $\frac{1}{2}$  mg Atropin als reizend für den menschlichen Herzvagus bei sowohl subkutaner wie intravenöser Applikation. Bei grösseren Dosen reicht die Zeit bei intravenöser Injektion nicht zum Erscheinen eines Reizeffekts aus.

Mc GUIGAN (1921) fand nach  $\frac{1}{2}$  mg Atropin fast regelmässig eine Herabsetzung der Pulsfrequenz,  $\frac{1}{2}$ —1 mg bewirkte ebenfalls oft eine Verlangsamung, während 2 mg nur eine rasch vorübergehende Reizung hervorriefen, welche von einer bei dieser Dosis regelmässig auftretenden Vaguslähmung mit Pulsbeschleunigung abgelöst wurde. RUDOLF und BULMER (1924) behaupten, dass Atropin in kleinen Dosen zu Bradykardie durch zentrale Vagusreizung führt. In der Grenzzone zwischen reizender und lähmender Dosis heben die beiden Wirkungen einander auf. Die absolute Dosis für einen derartigen Ausgleich wechselt individuell.

HERXHEIMER (1921) behandelt in einer Übersicht den Begriff „Bradykardie“ und macht auch auf die behauptete initiale Reizung aufmerksam, welche das Atropin auf den Herzvagus ausüben soll. Er beleuchtet die Frage mit einer Serie eigener Untersuchungen, deren Methodik einen methodischen Fehler zutage bringt, was für mehrere der oben zitierten Autoren ebenfalls zutrifft. Er meint nämlich, dass eine Ruhelage in bezug auf die Herzarbeit bereits eintritt, wenn eine Versuchsperson 10 Minuten lang stillgesessen hat. Es kann selbstverständlich mit Bestimmtheit geltend gemacht werden, dass 10 Minuten eine viel zu kurze Zeit ist, um basale Bedingungen hinsichtlich der Herzarbeit eintreten

zu lassen. Man braucht nur an unsere routinemässigen Forderungen bezüglich vorausgehender Ruhe bei der Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs bei Patienten zu denken.

Derartige methodische Fehler dürften die Veranlassung dafür sein, dass die meisten Hand- und Lehrbücher der Pharmakologie die Untersuchungen, bei welchen man eine initiale Vagusreizung durch Atropin nachweisen zu können geglaubt hatte, mit Stillschweigen übergehen.

Es scheinen indessen einige Untersuchungen anderer Art aus späteren Jahren der Theorie von der initialen Reizung eine gewisse Stütze verliehen zu haben. So hat GREMELS (1936) gezeigt, dass sehr kleine Atropindosen bei der Katze die Reizbarkeit des Vagus steigern können. Der Beweis dafür, dass dieser Reizungseffekt auch beim Menschen unter basalen Bedingungen zum Vorschein kommt, steht jedoch noch aus.

Was Untersuchungen über die quantitative Wirkung des Atropins als Herzfrequenzsteigerndes Mittel betrifft, so können hier nur einige grössere Arbeiten besprochen werden. MÜLLER (1891) fand, dass 1 mg Atropin subkutan im Alter 16—40 Jahre eine durchschnittliche Frequenzsteigerung der Herzaktion von etwas unter 50 % und im Alter 50—86 Jahre eine solche von knapp 25 % auslöste. Diese Beobachtungen stimmen mit den allgemeinen Erfahrungen über Variationen des Vagustonus mit dem Lebensalter gut überein. CUSHNY, MARRIS und SILBERBERG (1921) konnten indessen bei bestimmten Individuen auch nach grossen Atropindosen nicht die geringste Pulsbeschleunigung nachweisen.

Bei einer Untersuchung an über 60 Studenten beobachtete NICHOLSON (1926) nach 2 mg Atropin subkutan im Laufe von 20—30 Minuten eine durchschnittliche Frequenzzunahme um fast 40 Schläge in der Minute. Als Gegenstück hierzu kann eine Arbeit von CRAWFORD (1924) angeführt werden, welcher nach 1,2—2 mg eine Pulsbeschleunigung um im Mittel 20—40 Schläge pro Minute konstatierte, welche bei jüngeren Individuen besonders ausgesprochen war. Maximale Pulssteigerung wurde erst nach ca. 6 mg erhalten.

Über den Einfluss des Atropins auf das Minutenvolumen des Herzens liegen wechselnde Befunde vor. Grundsätzlich hätte man

Veranlassung, eine Steigerung zu erwarten, wenigstens bei denjenigen Dosen, welche die Frequenz des Herzens merkbar steigern. Eine solche Zunahme wurde zuerst im Tierversuch von ODAIRA (1925) nachgewiesen, der bei Kaninchen mit der Fickschen Methode nach Dosen von 0,2—0,5 mg Atropinsulfat pro kg Versuchstier bei intravenöser Zufuhr eine Steigerung des Minutenvolumens fand, welche zwischen 4 % und 33 % schwankte. MARSHALL (1926) dagegen konnte bei Hunden mit derselben Methodik nicht einmal nach 3—4 mg ein erhöhtes Minutenvolumen feststellen. Ebenso wenig konnten HARRISON, BLALOCK, PILCHER und WILSON (1927) in Tierversuchen trotz Pulsbeschleunigung zwischen 100 und 400 % eine Beeinflussung des Minutenvolumens konstatieren.

Die ersten Beobachtungen am Menschen stammen von SMITH, BURWELL und DE VITO (1928), welche mit der Field-Bockschen Methode bei Studenten nach 1,2 mg Atropin intravenös eine Steigerung des Minutenvolumens um ca. 10 % fanden. Gleichzeitig stieg die Pulsfrequenz um ca. 40 %, während sich der Blutdruck nicht änderte. Mittels der Grollmanschen Azetylenmethode registrierte DOMENJOZ (1941) ein um durchschnittlich 20 % erhöhtes Minutenvolumen bei zwei Versuchspersonen nach 1 mg Atropinsulfat subkutan, während die Pulsfrequenz dabei um 20—50 % stieg.

Irgendwelche vergleichenden Untersuchungen über den Effekt verschiedener anticholinergischer Substanzen auf das Minutenvolumen des Menschen waren im zugänglichen Schrifttum nicht zu finden.

Die Wirkung des Atropins auf den Blutdruck beim Menschen ist ebenfalls verschieden beurteilt worden. Unter gewissen Versuchsbedingungen wurden Steigerungen beobachtet, unter anderen Senkungen. Die vielfachen Widersprüche werden von PFANKUCH (1939) u. a. dem Umstand zur Last gelegt, dass die Gefässwirkung des Atropins an und für sich verhältnismässig geringfügig ist, weshalb der Blutdruckeffekt ein Resultat des Einflusses auf die Pulsfrequenz und den Herzmuskel wird, welcher unter gewissen Verhältnissen einer lähmenden Einwirkung ausgesetzt werden soll.

Nach DANIELOPOLU und ASLAN (1925) bewirken kleine Dosen Atropin beim Menschen bei intravenöser Zufuhr Blutdrucksfall,

während grössere Mengen den Druck steigern. PLAVSIC (1939) sah meistens Blutdrucksteigerung nach grossen Dosen.

Hinsichtlich der Gefässwirkung des Atropins sei schliesslich hinzugefügt, dass auch periphere Gefässe, nicht zuletzt die der Haut, beeinflusst werden, und zwar wahrscheinlich schon von Dosen, welche als therapeutisch bezeichnet werden können. Bei Vergiftungen ist jedenfalls die Beeinflussung peripherer Gefässe in Gestalt einer intensiven, zuweilen exanthemähnlichen Hautrötung seit langem bekannt. Diese Rötung beruht auf einer peripheren Gefässerweiterung (Kapillarpaprose) und bildet einen auffallenden Gegensatz zu der durch Lähmung der Schweissdrüsen abnormen Hauttrockenheit. Die durch die Schweissdrüsenlähmung verursachte Erschwerung der Wärmeregulation dürfte übrigens nach u. a. SEGERDAHL (1934) die wesentliche Ursache der Hyperpyrexie bei schweren akuten Atropinvergiftungen darstellen. Der Einfluss des Atropins auf die Hautgefässe war schon von ALBERTONI (1882) und PICK (1899) nachgewiesen worden, während MORAT und DOYON (1892) experimentell gezeigt haben, dass Atropin die Körpertemperatur zu steigern vermag.

Auch in bezug auf andere Gefässgebiete als die der Haut liegen Beobachtungen über die Wirkungen des Atropins vor. So fand SJÖSTRAND (1936) bei Mäusen und Meerschweinchen nach Atropindosen von 0,3—0,5 mg eine Zunahme der Blutmenge in der Leber und Niere sowie in der Skelettmuskulatur.

## B. Eigene Untersuchungen.

### 1. Methodik.

Die Zirkulationsuntersuchungen bestehen einerseits aus einer Serie Versuche; bei welchen neben der Registrierung der Pulsfrequenz und des Blutdrucks auch die Bestimmung des Minutenvolumens des Herzens durch Feststellung des Sauerstoffverbrauchs und der arteriovenösen Sauerstoffdifferenz unter dem Einfluss verschiedener anticholinergischer Substanzen ausgeführt wurde. Auf der anderen Seite wurde in einer zweiten Versuchsreihe nur die Wirkung verschiedener Anticholinergica auf die Pulsfrequenz studiert. Hierbei diente die bei den Speicheluntersuchungen nachge-



wiesene pilokarpin antagonistische Stärke der betreffenden Mittel als Ausgangspunkt für die Dosierung. Es wurde also ein Vergleich der Wirkungen auf den Salivationsmechanismus und auf den Herzvagus bezweckt und zugleich der relative Einfluss der verschiedenen Substanzen auf den Herzvagus geprüft. Sämtliche Untersuchungen sind an gesunden, jüngeren Individuen ausgeführt worden.

Die erste Versuchsserie enthält drei Versuchspersonen. Die Versuche wurden morgens, bei nüchternem Magen und nach ca. einstündiger absoluter Muskelruhe im Liegestuhl vorgenommen. Besonderer Wert wurde darauf gelegt, einen möglichst vollständigen Ruhezustand zu erhalten, sowie darauf, dass die Versuchsperson während des ganzen Versuchs die Muskelruhe beibehielt. Nachdem Ruhelage eingetreten war, wurden Blutdruck und Pulsfrequenz ungefähr jede 5. Minute bestimmt. Der Blutdruck wurde mittels der von LILJESTRAND und ZANDER (1928) angegebenen Methylenjodidmanometermethode gemessen, welche exaktere Bestimmungen gestattet, als die sonstigen üblichen Manometertypen zur unblutigen Registrierung. Die Pulsfrequenz wurde durch Zählung des Radialispulses während einer Minute festgestellt. Jeder Versuch wurde mit der Bestimmung eines oder mehrerer Ruhewerte für das Minutenvolumen eingeleitet, bevor die anticholinergischen Mittel injiziert wurden, was subkutan in wechselnden Dosen erfolgte. Die Minutenvolumenbestimmungen, welche mittels der GROLLMANSchen Azetylenmethode (1932) vorgenommen wurden, sind jedesmal mit der Feststellung des respiratorischen Gaswechsels derart, dass während 5—10 Minuten die Ausatemungsluft der Versuchsperson in ein Sammelspirometer geleitet wurde, aus welchem man nach Ermittlung der Grösse der Ventilation Proben zur Gasanalyse entnahm, begonnen worden. Die Lungen der Versuchsperson konnten durch einen Dreiwegehahn abwechselnd mit der Aussenluft, dem Spirometer oder einer Gummiblase mit Azetylen-Sauerstoff-Luftgemisch zur Grollmanbestimmung in Verbindung gebracht werden, ohne dass Mundstück oder Nasenklemme während des ganzen Versuchs entfernt zu werden brauchten. In bezug auf nähere Einzelheiten der Grollmanschen Methode wird auf die einschlägige Monographie dieses Autors (1932) verwiesen.

Nachdem die anticholinergischen Substanzen subkutan injiziert worden waren, wurden an zwei Zeitpunkten, etwa  $\frac{1}{2}$  und 1 Stunde nach der Injektion, erneute Bestimmungen des Minutenvolumens vorgenommen. Während dieser Zeitspanne kann man nämlich mit dem stärksten Effekt rechnen. U. a. kulminiert eine etwaige Pulsbeeinflussung während dieses Zeitabschnitts.

Die Gasanalysen vom Spirometer und von der Bestimmung der arteriovenösen Sauerstoffdifferenz wurden im Haldaneapparat ausgeführt.

Bei der zweiten Versuchsreihe wurden nur Pulsfrequenzbestimmungen vorgenommen, in der Absicht, zu einer Anschauung über den Einfluss verschiedener anticholinergischer Substanzen auf den Herzvagus zu gelangen. Die Versuche sind an einer grösseren Anzahl jüngerer, gesunder Individuen ausgeführt worden, bei deren Auswahl der Wunsch leitend war, dass variierende, konstitutionell bedingte Frequenzunterschiede der Herzaktion vertreten sein sollten. Auch bei dieser Serie wurde der grösste Wert darauf gelegt, dass die Versuche in absoluter Ruhe begonnen würden. In der Regel liess sich eine minimale, gewöhnlich von Tag zu Tag reproduzierbare Pulsfrequenz bei den untersuchten Personen nach etwa einstündiger absoluter Muskelruhe erzielen. Dies war besonders wichtig, sowohl im Hinblick auf den Nachweis eines eventuellen initialen Reizeffekts anticholinergischer Mittel, als auch im Gedanken daran, dass man sich hierdurch mit verhältnismässig kleinen Dosen der Alkaloide begnügen konnte. Letzteres war erwünscht, einmal um den Versuchspersonen Unbehagen zu ersparen, sodann um das Risiko einer etwaigen Gewöhnung zu reduzieren. Schliesslich wurden einige ergänzende Versuche über den Einfluss von Alkaloiden der Atropingruppe auf die Hauttemperatur angeschlossen, in der Absicht, den Mechanismus der in gewissen Fällen nachgewiesenen Steigerung des Minutenvolumens des Herzens zu beleuchten.

## 2. Resultate.

Die erste Versuchsreihe enthielt drei jüngere, männliche Versuchspersonen, bei welchen Minutenvolumen des Herzens, Pulsfrequenz und Blutdruck unter Standardbedingungen vor und nach subkutaner Injektion einiger aktiver Anticholinergica festgestellt

wurden. Es erwies sich als unmöglich, bei diesen Untersuchungen schwächere Anticholinergica zu verwenden. Präliminäre Schätzungen des Herzvaguseffekts derselben gelegentlich der Speicheldrüsenuntersuchungen ergaben nämlich, dass mehrere von ihnen in unter dem Gesichtspunkt des Pilokarpinantagonismus äquivalenten Dosen keinen Einfluss auf den Herzvagus aufwiesen. Die bei grossen Dosen recht ausgesprochenen zentralen Wirkungen derselben machen sie zu Untersuchungen über das Minutenvolumen ungeeignet. Bei der zweiten Versuchsserie, in der nur die Pulsfrequenz beobachtet wurde, sind jedoch einige schwächere Anticholinergica in unter dem Gesichtspunkt des Pilokarpinantagonismus äquivalenten Dosen geprüft worden. Die Hauptresultate der ersten Versuchsserie sind in der hier eingefügten Tabelle 14 wiedergegeben. Die zum Vergleich bei der Beurteilung des Effekts der anticholinergischen Substanzen dienenden Ausgangsdata sind in Tab. 15 zusammengestellt, welche statistisch bearbeitete Ruhewerte aus Tab. 14 enthält.

Das Minutenvolumen zeigt durchweg nach Injektion derjenigen Derivate, welche durch Herzvaguspause zu einer erhöhten Schlagfrequenz führen, eine mässige, aber gesicherte Steigerung. Diese Zunahme bezieht sich ausschliesslich auf eine Verringerung der arteriovenösen Sauerstoffdifferenz, während der Sauerstoffverbrauch nicht beeinflusst wird. Im Bereich der beobachteten Pulsfrequenzen liegt eine direkte Proportionalität zwischen dem Grade der Pulsfrequenzsteigerung und der Zunahme des Minutenvolumens vor.

Die bei Atropinsulfat konstatierte Erhöhung des Minutenvolumens beläuft sich maximal auf im Mittel ca. 17 %, während die diesbezügliche Wirkung des l-Hyoscyamins 40 % übersteigt. Die Streuung ist hier jedoch eine erhebliche. Keine maximale Steigerung unterschreitet indessen 20 %. Atropinmethylnitrat, welches nur bei einer Versuchsperson geprüft wurde, bewirkte eine Steigerung von nahezu 80 %. Das Skopolamin wiederum lässt in der angewandten Dosis, welche unter dem Gesichtspunkt des Pilokarpinantagonismus mehr als 2 mg Atropin entspricht, eine Beeinflussung des Pulses gänzlich vermissen. Auch das Minutenvolumen wird nicht nennenswert berührt. Das gleiche gilt von der einzigen

Tabelle 14.

Wirkung verschiedener anticholinergischer Substanzen auf Sauerstoffverbrauch, Pulsfrequenz, Blutdruck und Minutenvolumen des Herzens bei 3 gesunden, männlichen Versuchspersonen.

Substanz und Dosis in mg pro 10 kg Kgw.	Ver- suchs- person	Vor der Injektion				30—40 Min. nach Injektion				60—70 Min. nach Injektion				Maximale Steige- rung des Minuten- volumens in %
		O <sub>2</sub> - Ver- brauch in ml pro Min.	Puls- freq. pro Min.	Blut- druck in mm Hg	Min- volumen des Herzens l	O <sub>2</sub> - Ver- brauch in ml pro Min.	Puls- freq. pro Min.	Blut- druck in mm Hg	Min- volumen des Herzens l	O <sub>2</sub> - Ver- brauch in ml pro Min.	Puls- freq. pro Min.	Blut- druck in mm Hg	Min- volumen des Herzens l	
0,02 mg Atropinsulfat	J.	223	63	123/74	3,9	248	82	139/73	4,5	248	83	150/83	4,5	15
	R.	246	58	98/58	3,5	253	98	111/73	4,1	253	88	103/71	3,9	17
	Ü.	239	54	129/90	3,4	242	84	136/96	4,0	246	78	140/98	—	18
0,02 mg l-Hyoseya- min	J.	236	64	122/76	3,9	236	100	130/82	5,2	230	92	132/80	4,2	33
	R.	258	51	107/74	3,7	258	96	128/86	6,6	267	89	137/88	5,9	78
	Ü.	250	55	128/88	3,2	248	88	148/99	4,1	242	86	146/98	3,8	28
0,01 mg Skopolamin- hydrochlorid	J.	244	62	122/70	3,9	244	61	120/70	4,1	—	62	120/74	—	5
	R.	244	52	99/60	3,5	242	52	96/60	3,4	241	52	98/57	3,5	0
0,02 mg Atropin- methylnat	Ü.	236	54	122/83	3,2	236	85	137/92	3,7	222	98	143/93	5,7	78
0,1 mg Homatropin- hydrobromid	R.	260	51	110/73	3,6	264	51	116/78	3,8	264	50	117/74	3,7	6

Tabelle 15.

*Normalwerte für O<sub>2</sub>-Verbrauch, Pulsfrequenz und Minutenvolumen des Herzens bei den Versuchspersonen J., R. und Ü*

Versuchsperson	O <sub>2</sub> -Verbrauch in ml pro Min.	Pulsfrequenz pro Min.	Minutenvolumen des Herzens in l
J. ♂	234,8 ± 6,1	63,0 ± 0,6	3,90 ± 0,00
R. ♂	252,0 ± 4,1	53,0 ± 1,7	3,58 ± 0,05
Ü. ♂	241,6 ± 4,2	54,3 ± 0,8	3,27 ± 0,05

Beobachtung mit Homatropin, dessen Dosis jedoch nur ¼ mg Atropin entspricht.

Der Blutdruck weist ebenfalls eine sichere Änderung auf, indem in sämtlichen Fällen, wo Pulsfrequenz und Minutenvolumen zunahmen, auch der Blutdruck stieg, in gewissen Fällen sogar in bemerkenswert hohem Grade. Die Steigerung betrifft durchweg sowohl systolischen wie diastolischen Druck. Der Blutdruckeffekt ist von ungefähr derselben Dauer wie die übrigen Wirkungen.

Die nachgewiesene Beziehung zwischen der Steigerung der Pulsfrequenz und der des Minutenvolumens unter dem Einfluss von Anticholinergica ist eine so regelmässige, dass ein Kansalzusammenhang vorliegen dürfte. Die Herzwirkung der anticholinergischen Mittel besteht in einer Vagusparese, die den Accelerans die Oberhand gewinnen lässt. Es entsteht da die Frage, ob die nachgewiesene Zunahme des Minutenvolumens durch eine Erhöhung der Schlagfrequenz verursacht sein kann, oder ob der Zusammenhang ein anderer ist. Nach KROGH (1912) beeinflusst eine Frequenzänderung der Herzaktion innerhalb gewisser Grenzen das Schlagvolumen in dem Sinne, dass dieses bei sinkender Frequenz etwas zu- und bei steigender Frequenz etwas abnimmt. Die Differenzen sind indessen ziemlich klein, so dass das Minutenvolumen hauptsächlich durch die Frequenz bedingt wird, zu der es innerhalb gewisser Grenzen eine direkte Proportionalität aufweist.

WIGGERS (1934) führt einige Zahlen an, welche diese Verhältnisse beleuchten. Wird die Herzfrequenz im Tierversuch durch künstliche Reizung der rechten Vorhofs auf über 80 Schläge pro Minute gesteigert, so beginnt der diastolische Füllungsgrad der Kammer allmählich zurückzugehen, was eine Abnahme des Schlag-

volumens zur Folge hat. Das Minutenvolumen steigt aber infolge der Frequenzsteigerung bis zur Frequenz von etwa 120 Schlägen pro Minute weiter, die Zunahme ist hier jedoch nicht länger proportional zur Erhöhung der Frequenz. Bei 120—180 Schlägen pro Minute wird das Schlagvolumen praktisch proportional zur Frequenzsteigerung reduziert, weshalb das Minutenvolumen annähernd konstant bleibt, um bei noch höheren Schlagfrequenzen infolge mangelhafter diastolischer Füllung rasch abzunehmen.

Im Lichte dieser theoretischen Ableitungen und der im Tierversuch gemachten Beobachtungen kann die hier konstatierte Steigerung des Minutenvolumens im Zusammenhang mit der von der Vagusparese bedingten Frequenzerhöhung begreiflich erscheinen.

Eher ist die Blutdrucksteigerung paradox, da die auf dem Einfluss von Anticholinergica beruhenden Zirkulationsverhältnisse, theoretisch betrachtet, eigentlich mit einem Sinken des Blutdrucks Hand in Hand gehen müssten. DANIELOPOLU und ASLAN (1925) haben die Drucksteigerung als ein Resultat der Lähmung der Vasodilatoren des Splanchnicusgebiets zu erklären versucht. Die diesbezüglichen experimentellen Unterlagen sind jedoch strittig. Es ist indessen nicht auszuschliessen, dass die Blutdrucksteigerung auf einen anticholinergischen Effekt auf blutdruckregelnde Mechanismen zurückzuführen ist, was sich selbstverständlich nur durch Tierversuche klären lässt.

Der Nachweis einer Erhöhung des Minutenvolumens bringt aber noch ein Problem mit sich, nämlich das, wohin sich der gesteigerte Blutstrom wendet. Die bei Atropinvergiftungen fast regelmässig zu konstatierende Hautrötung, welche im Gesicht besonders deutlich zu sein pflegt, gibt einen Fingerzeig, dass periphere Gefässgebiete von Atropin beeinflusst werden. Tatsächlich ist eine merklich röttere Gesichtsfarbe schon nach Dosen von 1—2 mg Atropin oder äquivalenten Mengen sonstiger aktiver Anticholinergica zu beobachten. Bei den hier angewandten Versuchspersonen sah man nach diesen Dosen oft eine Rötung des Gesichts, und manchmal gaben die Versuchspersonen selbst spontan Wärmegefühl im Gesicht an. Die Intensität dieser Erscheinungen war jedoch bei den verwendeten Dosen niemals mit der z. B. von  $\frac{1}{2}$  mg Histamin verursachten zu vergleichen. Die röttere Gesichtsfarbe braucht jedoch nicht mit gesteigerter Durchblutung verbunden zu sein. Im

Schrifttum scheint ziemlich ausnahmslos die Ansicht vertreten zu werden, dass diese Atropinwirkung eine Gefäßsparese ist. Entscheidend dürfte hierbei die Hauttemperaturmessung sein. Das wechselnde und labile Verhalten der Gefäße im Gesichte begrenzt indessen den Wert und die Beweiskraft derartiger Messungen beträchtlich. Hier mag jedoch das Resultat einer Messung wiedergegeben werden, welche gelegentlich der Bestimmung des Minutenvolumens nach Injektion von 0,1 mg Atropinmethylnitrat pro 10 kg Körpergewicht bei Versuchsperson Ö. vorgenommen wurde. Die Werte gehen aus Tab. 16 hervor, die eine steigende, auf vermehrte Durchblutung hindeutende Gesichtstemperatur zeigt.

Tabelle 16.

*Gesichtstemperatur nach 0,1 mg Atropinmethylnitrat pro 10 kg Körpergewicht bei Versuchsperson Ö. mit Elektrothermometer gemessen.*

Stelle	Minuten vor der Injektion		Minuten nach Injektion	
	30	20	20	30
Stirn .....	34,8°	35,1°	36,8°	36,8°
rechte Wange .....	34,2°	34,8°	36,8°	36,0°
linke Wange .....	33,9°	34,0°	36,7°	35,8°

Das Verhalten der Hauttemperatur an Armen und Händen wurde bei anderer Gelegenheit an der gleichen Versuchsperson unter dem Einfluss von 0,2 mg Atropinsulfat pro 10 kg Körpergewicht untersucht. Die Resultate sind in Tab. 17 angegeben, aus welcher eine Senkung der Hauttemperatur im Laufe des Versuchs ersichtlich wird. Dieser wurde in der Weise ausgeführt, dass Arme und Hände der Versuchsperson während einer Stunde vor der Atropininjektion bei vollständiger Muskelruhe in Zimmertemperatur (23°) exponiert wurden. Eine generell gesteigerte Hautdurchblutung ist, zumindest diesen Versuchen nach, nicht als Erklärung des Problems, wohin das erhöhte Minutenvolumen distribuiert wird, anzunehmen. Plethysmogramme wurden nicht aufgenommen. Die Frage muss hier offengelassen werden.

Die zweite Versuchsserie besteht aus Pulsfrequenzbestimmungen unter Standardbedingungen nach Injektion einiger verschiedener anticholinergischer Substanzen. Die Versuchspersonen sind, wie

Tabelle 17.

Hauttemperatur nach 0,2 mg Atropinsulfat subkutan pro 10 kg Körpergewicht bei Versuchsperson Ö. mit Elektrothermometer gemessen.

S t e l l e	Unmittelbar vor der Injektion	Minuten nach Injektion etwa		
		30	45	60
Vol. dig. I man. dx. ....	26,4°	24,5°	24,9°	24,9°
Vol. dig. II man. dx. ....	26,3°	24,3°	24,6°	24,6°
Vol. dig. III man. dx. ....	26,2°	24,2°	24,6°	24,7°
Vol. dig. IV man. dx. ....	26,1°	24,3°	24,7°	24,8°
Vol. dig. V man. dx. ....	25,5°	24,3°	24,6°	24,7°
Vola man. dx. ....	28,8°	27,4°	27,3°	27,4°
rechtes Handgelenk ....	29,6°	28,3°	28,2°	28,4°
Vol. dig. I man. sin. ....	26,8°	25,2°	25,6°	25,9°
Vol. dig. II man. sin. ....	26,5°	24,5°	24,9°	25,3°
Vol. dig. III man. sin. ....	26,0°	24,4°	24,9°	25,5°
Vol. dig. IV man. sin. ....	25,7°	24,4°	25,1°	25,9°
Vol. dig. V man. sin. ....	25,8°	24,9°	25,7°	26,1°
Vola man. sin. ....	29,3°	28,2°	28,1°	28,5°
linkes Handgelenk ....	29,8°	28,9°	28,7°	28,5°

oben hervorgehoben wurde, unter dem Gesichtspunkt ausgewählt worden, verschiedene Grade von konstitutionell bedingtem Herzvagus-tonus vertreten sein zu lassen. Die Resultate werden zusammengefasst in Tab. 18 angeführt.

Ein befriedigendes Kriterium für die Einheitlichkeit der Ausgangslage bietet die von einem Mal zum anderen konstante Frequenz des Ruhepulses bei den verschiedenen Versuchspersonen. Die konstitutionell bedingten Frequenzunterschiede machen sich in erwünschtem Grade bemerkbar. *In keinem Fall liess sich im Anschluss an die Injektionen der Anticholinergica eine sichere initiale Frequenzverminderung nachweisen.* Das Material, auf welches sich diese Behauptung stützt, nämlich die einzelnen Pulskurven, kann hier aus Gründen der Platzersparnis nicht in extenso wiedergegeben werden, u. a. deshalb nicht, weil es ausser der Feststellung des Fehlens einer initialen Reizung nichts qualitativ Neues bringt. Damit eine eventuelle initiale Herzvagusreizung nicht übersehen werde, wurde die Pulsfrequenz ausnahmslos jede 5. Minute gezählt. Es kann mithin behauptet werden, dass die von älteren Untersuchern nicht selten beobachtete initiale Frequenzabnahme,



Tabelle 18.

*Pulswirkung einiger aktiver anticholinergischer Substanzen bei einer Reihe Versuchspersonen mit verschiedenen basalen Pulsfrequenzen als Ausdruck konstitutionell verschiedenen Herzvagus-tonus.*

Ver- suchs- per- son	S u b s t a n z	Dosis in mg	Dosis in % pro 10 kg Kgw. etwa	Initiale Pulsfre- quenz im Mit- tel pro Min.	Maxi- male Pulsfre- quenz pro Min.	Steige- rung in % etwa
N. ♂	Atropinsulfat .....	0,84	100	50	60	20
Ö. ♂	Atropinsulfat .....	0,72	100	58	74	28
H. ♀	Atropinsulfat .....	0,65	100	85	103	21
P. ♀	Atropinsulfat .....	1,20	200	43	92	114
Ö.	Atropinsulfat .....	1,44	200	54	84	56
R. ♂	Atropinsulfat .....	1,34	200	58	98	69
J. ♂	Atropinsulfat .....	1,48	200	63	86	37
H.	Atropinsulfat .....	1,30	200	84	115	37
N.	l-Hyosecyamin .....	0,42	50	51	61	20
Ö.	l-Hyosecyamin .....	0,36	50	54	72	33
R.	l-Hyosecyamin .....	1,34	200	51	96	88
Ö.	l-Hyosecyamin .....	1,44	200	55	88	60
J.	l-Hyosecyamin .....	1,48	200	64	103	61
Ö.	Atropinmethylnitrat .....	0,24	33	55	64	16
P.	Atropinmethylnitrat .....	0,60	100	43	118	175
N.	Atropinmethylnitrat .....	0,84	100	52	90	73
Ö.	Atropinmethylnitrat .....	0,72	100	55	95	73
H.	Atropinmethylnitrat .....	0,65	100	84	123	46
Ö.	Skopolaminhydrobromid ....	0,36	50	54	54	0
R.	Skopolaminhydrobromid ....	0,68	100	52	52	0
J.	Skopolaminhydrobromid ....	0,74	100	62	64	3
H.	Atropin-N-Oxydhydrochlorid	2,00	300	80	82	2
N.	Atropin-N-Oxydhydrochlorid	3,40	400	50	61	22
Ö.	Atropin-N-Oxydhydrochlorid	2,80	400	55	73	33
N.	Homatropinmethylnitrat ....	3,40	400	52	63	21
Ö.	Homatropinmethylnitrat ....	2,80	400	55	73	33
R.	Homatropinhydrobromid ...	6,70	1000	52	52	0
Ö.	Homatropinhydrobromid ...	18,0	2500	55	71	29
N.	Homatropinhydrobromid ...	22,6	2700	52	62	19

welche einer Herzvagusreizung zugeschrieben wurde, wahrscheinlich damit zusammenhängt, dass beim Beginn der Versuche nicht der basale Ausgangszustand hinsichtlich der Pulsfrequenz vorlag.

Übrigens kann in diesem Zusammenhang angeführt werden, dass eine Parasympathicusreizung beim Menschen in der Regel nicht zu einer Abnahme der Herzfrequenz führt, sondern zum Gegenteil. Dies hat, wie man meint, seinen Grund darin, dass die Vagusreizung primär eine Blutdrucksenkung bewirkt, welche durch eine Steigerung der Schlagfrequenz kompensiert wird, die eine Tendenz zur Frequenzabnahme verdeckt. Bei den hier vorliegenden Untersuchungen konnte indessen keine derartige Blutdrucksenkung in denjenigen Fällen beobachtet werden, wo Messungen ausgeführt wurden, nämlich bei den Bestimmungen des Minutenvolumens, bei welchen aktive anticholinergische Mittel mit Wirkung auf den Herzvagus regelmässig eine sichere Blutdrucksteigerung verursachten.

Die Tabelle bestätigt ferner die schon früher wohlbekannte Tatsache, dass die prozentuale Pulsfrequenzsteigerung durch ein und dieselbe Dosis anticholinergischer Substanz um so grösser ist, je niedriger die Frequenz anfangs war. Oder, anders ausgedrückt: ein konstitutionell bedingter hoher Herzvagustonus ist hemmenden Einflüssen relativ zugänglicher als ein niedrigerer Vagustonus. Die Erscheinung, deren generelles Vorkommen später erörtert werden wird, macht sich, wie bei diesen Untersuchungen über cholinergische Funktionen bereits gezeigt wurde, sowohl bei der Speichelsekretion wie bei der Lichtreaktion der Pupille geltend. Was die mathematische Analyse dieser Beziehung zwischen Funktionsgrad und Hemmung der Pulsfrequenz betrifft, so sind Material und Methode nicht von der Beschaffenheit, dass sich ebenso genaue Berechnungen wie in bezug auf die Speichelabsonderung und Lichtreaktion der Pupille anstellen liessen. Dass hinsichtlich der Herzfrequenz eine Erscheinung derselben Art vorliegt, ist offensichtlich.

Betreffs der Reaktion einer und derselben Versuchsperson auf steigende Dosen verschiedener Anticholinergica wird auf die Tabelle verwiesen, welche im Bereich der untersuchten Frequenzen die Behauptung stützt, dass der prozentuale Wert der Frequenzsteigerung im grossen ganzen proportional zur Dosis ist.

Was ferner den relativen Effekt verschiedener anticholinergischer Substanzen auf den Herzvagus anlangt, so fällt zunächst in die Augen, dass das Skopolamin in angewandten Dosen über-

haupt keine nachweisbare derartige Wirkung hat. Gleichgrosse Dosen von Atropinsulfat bewirken eine sichere Steigerung um im Mittel ca. 25 %. Wenn die Herzvaguswirkung des Skopolamins proportional zur pilokarpin antagonistischen Stärke desselben bei der Speichelsekretion wäre, müsste seine Herzvaguswirkung etwa die dreifache des Atropins sein. Das ist indessen mit Sicherheit nicht der Fall. Die Beobachtung steht auch mit früheren Feststellungen im Einklang. Das l-Hyoscyamin hat im Vergleich zu Atropin in halber Dosis dieselbe Herzvaguswirkung wie jenes, was zu erwarten war. Atropinmethylnitrat wiederum weist einen Effekt auf den Herzvagus auf, der denjenigen sicher überschreitet, mit welchem man im Hinblick auf die pilokarpin antagonistische Stärke dieses Mittels in bezug auf die Speichelsekretion rechnen möchte. Derselbe ist der doppelte des Atropins, während die Herzvaguswirkung sicher grösser ist, wenigstens dreimal so gross wie beim Atropin.

Die übrigen, unter dem Gesichtspunkt des Pilokarpin antagonismus schwächeren Substanzen, Atropin-N-Oxyd, Homatropinmethylnitrat und Homatropin, lassen in äquivalenten Dosen eine Herzvaguswirkung erkennen, die auf ihrem Höhepunkt derjenigen nahekommt, welche man im Hinblick auf den Pilokarpin antagonismus erwarten würde. Dieser Effekt ist indessen von erheblich kürzerer Dauer als bei den stärkeren Substanzen.

### Zusammenfassung.

1. Aktive Anticholinergica lösen eine mässige, aber sichere Steigerung des Minutenvolumens des Herzens aus. Eine Ausnahme bildet das Skopolaminhydrobromid. Die Steigerung des Minutenvolumens steht mit der Herzvagusparese in Zusammenhang und ist im Bereiche der beobachteten Frequenzen hauptsächlich proportional zu der Pulsfrequenzsteigerung.

2. Der Sauerstoffverbrauch wird nicht beeinflusst. Der Blutdruck zeigt eine deutliche Steigerung in den Fällen, wo eine markante Frequenzerhöhung und Minutenvolumensteigerung zustande kommt.

3. Ein konstitutionell bedingter, hoher Herzvagustonus ist hemmender Einflüssen relativ zugänglicher als ein niedriger Vagus-

tonus. Dies steht in bester Übereinstimmung zu Beobachtungen über andere cholinergische Funktionen, wenngleich das Material keine mathematische Darstellung ermöglicht.

4. Anticholinergica mittlerer Stärke geben auch eine deutliche Herzvagusparese, deren Wirkungsdauer aber erheblich abgekürzt ist. Schwache Anticholinergica sind in verwendbaren Dosen auf den Herzvagus inaktiv.

5. Es wurde nie eine initiale Pulsfrequenzabnahme beobachtet, die einem Reizeffekt auf den Herzvagus zugeschrieben werden könnte.

6. Hauttemperaturmessungen gaben keine eindeutige Erklärung, wohin sich der nach Injektion von aktiven Anticholinergica gesteigerte Blutstrom wendet.

7. Im Vergleich zur bei den Speicheluntersuchungen nachgewiesenen pilokarpinantagonistischen Stärke der betreffenden Mittel wurden zwei wichtige Ausnahmen beobachtet. Das Skopolaminhydrobromid erwies sich in angewandten Dosen als völlig inaktiv, während Atropinmethylnitrat eine Wirkungsstärke auf den Herzvagus besitzt, die diejenige des Atropinsulfats etwa um das Dreifache übertrifft.

## 7. Kapitel.

# Beeinflussung der Magensaftsekretion.

### A. Frühere Untersuchungen.

Eine hemmende Einwirkung anticholinergischer Mittel auf die wenigstens teilweise vom Vagus gesteuerte Magensaftsekretion wurde schon frühzeitig für wahrscheinlich gehalten. Der stark hemmende Effekt der Belladonnaalkaloide auf die Speichelabsonderung dürfte die eigentliche Veranlassung dafür abgegeben haben, dass man eine Beeinflussung der Magensaftsekretion als plausibel erachtete, ehe noch experimentelle Belege hierfür vorlagen. Am Ende des vorigen Jahrhunderts beschäftigte sich die PAWLOWsche Schule mit äusseren Drüsensekretionen verschiedener Art, und hier nahm man auch zuerst das Problem des Einflusses anticholinergischer Mittel auf die Magensekretion in Angriff.

So wies NETSCHAJEW (1892) nach, dass Atropin bei Versuchen an Hunden, deren Vagus elektrisch gereizt wurde, die Magensaftabsonderung wesentlich hemmte. In der Folgezeit wurde diese Beobachtung von anderen Schülern PAWLOWS bestätigt und erweitert. USCHAKOW (1896) machte geltend, dass die erste, die sogenannte psychische oder zephale Phase der Magensaftsekretion durch Atropin gehemmt wurde, einerlei, ob der Reiz in Scheinfütterung oder in elektrischer Vagusreizung bestand. Bezüglich der zweiten, chemischen oder gastrischen Sekretionsphase stellte SANOSKI (1893), ebenfalls bei Versuchen an Hunden, fest, dass die Sekretion von Atropin merkbar gehemmt wurde, vorausgesetzt, dass sich das Reizmittel im Magen befand. Wurde letzteres dagegen parenteral, z. B. in Form von Fleischextrakt, zugeführt, so blieb das Atropin nach MOLNÁR (1909) sowie ZELJONY und SAWITSCH (1911) wirkungslos. BABKIN (1928) fasst die oben angeführten Beobachtungen so zusammen, dass die Drüsenelemente selbst nicht durch das Atropin paralysiert werden. „Der Mechanismus seiner Wirkung bei chemischen Erregern bleibt jedoch

nichtsdestoweniger unaufgeklärt." Auch die dritte oder intestinale Sekretionsphase des Magens kann nach IVY, LIM und MCCARTHY (1925) im Tierversuch von Atropin mehr oder weniger vollständig gehemmt werden.

An der Jahrhundertwende wurden einschlägige Fragen vielerorts zur Behandlung aufgegriffen, z. B. von RIEGEL (1899), der neben einer Serie Versuche an Hunden auch die ersten systematischen Beobachtungen an klinischem Material veröffentlichte. Schon früher waren indessen eine ganze Anzahl Einzelfeststellungen über die Atropinwirkung auf den Verdauungsverlauf gesammelt worden, vorwiegend jedoch von geringerem Wert, was hauptsächlich auf unzulängliche Methoden zurückzuführen ist.

RIEGEL, der die Beobachtungen der PAWLOWSchen Schule am Hund bestätigen konnte, gab die Resultate von etwa 80 klinischen Beobachtungen bekannt; es handelte sich dabei meistens um Uleusfälle. Mittels des üblichen Probefrühstückverfahrens wurden Menge und Azidität des ausgeheberten Mageninhalts untersucht, und zwar ohne und mit vorangehender Atropinisierung in zwischen  $\frac{1}{2}$  und 1 mg subkutan wechselnden Dosen. RIEGELS Beobachtungen veranlassten ihn zu der Schlussfolgerung, „dass Atropin auch beim Menschen sowohl die Stärke des Magensaftes als auch die Menge des Sekrets herabzusetzen vermag". Gestützt hierauf empfahl RIEGEL das Atropin zum klinischen Gebrauch bei Hypersekretion, ein Rat, welcher nicht ungehört verhallt ist.

Zur selben Zeit veröffentlichte SCHIFF (1900) Erfahrungen ähnlicher Art, und im gleichen Jahre gab v. ALDOR (1900) umfassende Nachprüfungen der RIEGELSchen Resultate bekannt. Menschen mit einheitlicher Diät während der Vorperiode, sowohl Gesunde wie Uleuspatienten, erhielten Probemahlzeiten ohne und mit Atropin in der Dosis 1 mg subkutan. In dem nach einer Stunde ausgeheberten Mageninhalt wurden Azidität und Pepsingehalt bestimmt. Es ergab sich, dass das Atropin eine hemmende Wirkung auf sowohl Azidität wie Pepsinsekretion entfaltete. Der Effekt peroraler Atropinisierung und der Dosis  $\frac{1}{2}$  mg subkutan wurde als merkbar unsicherer beurteilt. Eine Atropinmedikation von der Dauer etlicher Tage führte, wie man meinte, zu einer Abschwächung des Effekts. Eine mitunter beobachtete quantitative Zunahme des Mageninhalts wurde herabgesetzter Motorik zur Last gelegt.

CROHN (1918) bediente sich der fraktionierten Ausheberung der Probemahlzeit beim Studium der Atropinwirkung beim Menschen. In einigen Fällen von sogenannter Hyperazidität wurde nach 1 mg Atropin eine Steigerung der Azidität ohne Beeinflussung der Motorik konstatiert. Perorale Dosen, welche hinreichend waren, um Trockenheitsgefühl und Mydriasis hervorzurufen, bewirkten auch eine Aziditätszunahme. Die hemmende Wirkung des Atropins beobachtete CROHN überhaupt nur bei der postdigestiven Sekretion.

In einer kritischen Übersicht über die Pharmakodynamik des Magens fasste BASTEDO (1920) die derzeitigen Erfahrungen anderer mit Atropin und seine eigenen zusammen. Bei der gewöhnlichen sogenannten Hyperazidität mit normaler Sekretionsdauer haben Atropin oder Belladonna nach BASTEDO im Zusammenhang mit Mahlzeiten keinen merkbaren Effekt auf Sekretmenge oder Azidität, nicht einmal wenn das Atropin in subkutanen Maximaldosen gegeben wird. Bei kontinuierlicher Sekretion beschränkt Atropin in der Maximaldosis  $\frac{1}{2}$  Stunde vor der Probemahlzeit die Sekretmenge oder Azidität während der digestiven Phase nicht, hemmt diese aber, nachdem die Nahrung den Magen verlassen hat. In Fällen von kontinuierlicher Sekretion führte 3tägige Medikation von grossen Dosen Tinctura Belladonnae zu einer Steigerung der Azidität während der digestiven Phase. Die psychische oder zephale Sekretionsphase dagegen wurde von Atropin deutlich beeinträchtigt, was BASTEDO vom therapeutischen Standpunkt aus für unerwünscht hält.

KEETON, LUCKHARDT und KOCH (1920) zeigten bei Versuchen am Hund, dass die von der Nahrung hervorgerufene Magensaftsekretion (Phase II) viele Stunden lang von 1 mg Atropinsulfat intramuskulär unterdrückt werden konnte. Sowohl Menge wie Pepsingehalt sanken unter dem Einfluss des Atropins rasch, während die Azidität erst zurückging, als die Sekretionsmenge um 50—80 % verringert worden war.

Eine Sekretionsverminderung beim Menschen durch Atropindosen von 1—1,5 mg subkutan glaubten u. a. LOCKWOOD und CHAMBERLIN (1922) nachweisen zu können, welche ferner eine Aziditätsreduktion von 30 % fanden. Eine Aziditätsabnahme entsprechender Grösse wurde von MICHELSON und NEUMARK (1926)

angegeben. Diese Aziditätssenkung erklärten u. a. LOCKWOOD und CHAMBERLIN (1922) mit Regurgitation durch den offenen Pylorus.

KEEFER und BLOOMFIELD (1926) brauchten bei ihren Versuchen am Menschen 2—3 mg Atropin, um die Sekretion bei nüchternem Magen gänzlich zu unterdrücken, während der durch eine Alkoholprobemahlzeit hervorgerufene Magensaft von dieser Dosis nicht beeinträchtigt wurde. Diese Resistenz der von Alkohol ausgelösten Sekretion wurde später u. a. von GRAY (1940) bei Versuchen an Hunden mit Blindsack nach PAWLOW beobachtet. GRAY stellt das sekretionsstimulierende Vermögen des Alkohols dem des Histamins an die Seite, und zwar im Hinblick auf die verhältnismässig grosse Resistenz beider gegen Atropin.

KALK und SIEBERT (1927) untersuchten beim Menschen die Nüchternsekretion und die Sekretion nach Reizlösung (Koffein). Eine Neuerung stellte die Verwendung der kontinuierlichen Ausheberung des Sekrets mittels einer Saugvorrichtung dar, eine Methode, die vorher von KALK (1923) angegeben worden war, und der wir eine wesentliche Erweiterung unserer Kenntnisse über die Magensekretion zu verdanken haben. Ferner bedienten sich diese Forscher zweier Sonden, wie schon früher LIM, MATHESON und SCHLAPP (1923), wodurch sich Magen- und Duodenalinhalt getrennt aushebern liessen. Die Nüchternsekretion bei Ulcuspatienten wurde unter dem Einfluss von Atropin durchweg herabgesetzt, bisweilen völlig gehemmt befunden. Man verwendete Atropin und Bellafolin, welche intravenös in Dosen von  $\frac{1}{2}$ —1 bzw.  $\frac{1}{4}$ —1 mg gegeben wurden. Vergleiche machten ersichtlich, dass das Bellafolin die doppelte Wirkung des Atropins hatte. Die Azidität wurde nicht einheitlich beeinflusst, jedenfalls handelte es sich nicht um eine ausgesprochene und regelmässige Senkung. In der Mehrzahl der Fälle wurde sogar eine Steigerung konstatiert. Wenn Atropin oder Bellafollin gleichzeitig mit Koffeinelösung gegeben wurde, resultierte regelmässig eine Verlängerung der Leerungszeit des Magens und eine beträchtliche Herabsetzung der Azidität durch von den Autoren so bezeichnete „echte Aziditätshemmung“. Wurden die hemmenden Substanzen nach Verabreichung der Reizlösung injiziert, so ergab sich in der Mehrzahl der Fälle keine Aziditätssenkung, während die Nachsekretion regelmässig herabgesetzt wurde. Der Vergleich zwischen Atropin und



Bellafollin brachte keine prinzipiellen Unterschiede zutage, aber, wie oben erwähnt, das Stärkeverhältnis 1:2. Schliesslich betonen die Autoren, dass das Problem des Magenschmerzes und seiner Beeinflussbarkeit durch Atropin eher mit dem Tonus und der Motilität des Magens zusammenhänge als mit der Sekretion.

Die Sekretion bei nüchternem Magen hatte schon frühzeitig erhebliches Interesse wachgerufen. Man ging in bezug auf den Menschen anfangs in Analogie mit dem Sachverhalt beim Hund davon aus, dass diese Sekretion ein bedingter Reflex wäre, der auf dem Wege über den Vagus ausgelöst würde. Eine Ausschaltung der Vagusimpulse müsste zu einem Aufhören der Nüchternsekretion führen, wie es sich bei den Tierversuchen der PAWLOWsehen Schule ergeben hatte. So zeigte REHFUSS (1918); dass grosse subkutane Atropindosen beim Menschen die mit fraktionierter Methodik ausgeheberte Sekretion während der Phase I, welche eintrat, wenn die Versuchsperson eine Fleischmahlzeit betrachtete, deutlich hemmten. Die Sekretion liess sich jedoch in der Regel durch Atropin nicht gänzlich unterdrücken. KALK und SIEBERT (1927) bestreiten dies in ihrer oben zitierten Arbeit. Da die Quintessenz ihrer eigenen Beobachtungen die war, dass die Azidität der Nüchternsekretion kaum irgendwie beeinflusst wurde, die Quantität aber erheblich zurückging, während die Sekretion nach Zufuhr einer Reizlösung in beiden Beziehungen beträchtlich gehemmt wurde, hielten sie den Schluss für gerechtfertigt, dass entweder die Innervation der Nüchternsekretion eine ganz andere wäre als die der Sekretion nach Reizlösung, oder dass die gereizten säureproduzierenden Zellen um so atropinempfindlicher wären, in je höherem Grade von Aktivität sie sich befinden. Da die Forscher mehr zur ersteren Alternative neigen, folgt auf Grund der vagushemmenden Wirkung des Atropins, dass die atropinempfindlichste Sekretionsphase, d. h. in diesem Fall Phase II, unter stärkerem Vagusinfluss stehen muss als die Nüchternsekretion, deren Azidität durch Atropin nicht vermindert wird.

CHALFEN (1928) wiederholte diese Versuche und glaubte nachweisen zu können, dass 1 mg Atropin die Nüchternsekretion um über 90 % dezimierte. C. fasste diese Sekretion nicht als eine psychoreflektorische Erscheinung, sondern als ein in jedem Magen konstantes Phänomen auf. Die Sekretionsverhältnisse bei einer

auf die Nüchternuntersuchung unmittelbar folgenden Probemahlzeit liessen nach CHALFEN keine Beeinflussung durch das Atropin erkennen.

Schon frühzeitig hatten AUER und MELTZER (1906) die Vermutung geäussert, dass die wechselnde und unübersichtliche Wirkung des Atropins auf die Magensaftabsonderung in der Doppelnatur dieser Sekretion ihren Grund hätte: einerseits die nervös bedingte Phase I und andererseits die durch Anwesenheit von Nahrung im Magen ausgelöste Phase II. Die erstere, durch Atropin steuerbare Phase sollte auf dem Wege über den Auerbachschen Plexus der Magenwand beeinflusst werden, die letztere, digestive Phase sollte ihrem Wesen nach humoral bedingt und atropinresistent sein. Diese Ansicht ist später von vielen geteilt worden.

Die stimulierende Wirkung der Parasympathicomimetica auf die Magensaftsekretion ist im Prinzip lange bekannt gewesen. Von diesen Mitteln hat wenigstens das Pilocarpin eine gewisse experimentelle Verwendung gefunden. Infolge des Überwiegens anderer Effekte hat sich jedoch keine dieser Substanzen als Reizmittel für die Magensaftsekretion bei klinischen Untersuchungen einigermaßen einbürgern können.

Erst in dem ungefähr gleichzeitig von POPIELSKI (1920), KEETON, LUCKHARDT und KOCH (1920) sowie ROTHLIN und GUNDLACH (1921) eingeführten Histamin erhielt man ein voll brauchbares Mittel für das Studium der Magensaftsekretion, ohne dass Probemahlzeiten oder Reizlösungen nötig wären. Bei Versuchen an Hunden zeigte POPIELSKI (1920), dass das Histamin auch nach Vagotomie eine starke Sekretion hervorrief, sowie dass nicht einmal eine Dosis von 6—7 mg Skopolamin pro kg Versuchstier die Azidität in der von Histamin ausgelösten Sekretion zu senken vermochte, deren Menge um ca.  $\frac{3}{5}$  verringert wurde. Diese Quantitätsverminderung schrieb P. ohne nähere Begründung oder Erklärung einem Zirkulationseffekt des Skopolamins zu. Gestützt auf seine Erfahrungen meinte P. behaupten zu können, dass das Histamin seine Wirkung direkt auf das Drüsenparenchym ausübe. Dieser Anschauung schloss sich KOSKOWSKI (1921) an, und dieselbe hat sich seither im grossen ganzen durchgesetzt, obwohl Einwände keineswegs ausblieben. KEETON, LUCKHARDT und

KOCH (1920) wiesen einen reziprok-antagonistischen Effekt von Histamin und Atropin auf die Magensaftsekretion nach. Doch konnten nicht einmal Atropindosen in der Nähe der letalen den Histamineffekt gänzlich inhibieren.

Bezüglich des Histamineffekts ist von besonderem Interesse, dass laut Angabe von POLLAND (1930) wiederholte gleichgrosse Injektionen beim Menschen immer wieder in hohem Grade übereinstimmende Sekretionen auslösen. Setzt man gegen 0,1 mg Histamin pro 10 kg Körpergewicht 0,2 mg Atropin, so nimmt die Menge des Sekrets ab, während die freie Azidität etwas steigt. PORTER (1932) zeigte bei Versuchen mit fraktionierter Ausheberung, dass die von Histamin beim Menschen hervorgerufene Magensaftsekretion von 1 mg Atropin um ca. 50 % gehemmt werden konnte, ohne dass die Azidität merkbar beeinträchtigt wurde. Auch PORTER weist auf die Reproduzierbarkeit der von Histamin bei demselben Individuum bei verschiedenen Gelegenheiten ausgelösten Quantität der Magensaftsekretion hin.

VINEBERG und BABKIN (1931) verglichen die Eigenschaften des von Pilokarpin und Histamin hervorgerufenen Magensekrets. Während der Histaminsaft reichlich, stark sauer und chloridreich ist, ist der Pepsingehalt nur anfangs hoch (mechanische Ausschwemmung). Der Pilokarpinsaft wird von geringerer Quantität, grösserer Schleimbeimengung und hohem Pepsingehalt gekennzeichnet. Eine schwache Vagusreizung bewirkt überhaupt fast ausschliesslich Schleimproduktion. Dies ist die Ursache dafür, dass das Atropin in erster Linie eine Hemmung der Schleimerzeugung im Magen ausübt. Atropin in zu deutlicher Sekretionsbeschränkung hinreichenden Dosen hat deshalb zunächst eine Verminderung der Schleimproduktion zur Folge. Nach BASTEDO (1936) soll diese Hemmung der Schleimproduktion als ein ungünstiger Umstand bei der Atropinbehandlung von Ulcusfällen zu betrachten sein.

Auf der Suche nach einem mit Histamin vergleichbaren Reizmittel für die Magensaftsekretion fanden DETRE und SIVÓ (1925), dass Insulin diese Sekretion stimulierte. Die Wirkung wurde parallel dem hypoglykämischen Effekt des Insulins befunden und der Mechanismus für eine zentrale Vagusreizung gehalten. Die Sekretion kommt erst zum Vorschein, wenn sich der Blutzucker hypoglykämischen Werten nähert, was u. a. von ROHOLM (1930)

betont worden ist. Dass der Effekt als an neurale Impulse gebunden zu erachten ist, geht daraus hervor, dass derselbe nach OKADA (1929) und Mitarbeitern, LA BARRE und DE CESPÉDÈS (1931) sowie LEVIERATOS und TSELIOS (1936) von intakten Vagi abhängt.

Quantitative Vergleiche über die hemmende Wirkung verschiedener anticholinergischer Substanzen auf die unter verschiedenen Bedingungen hervorgerufene Magensaftsekretion sind nur in geringem Umfang vorgenommen worden. Ausser dem oben referierten Vergleich von KALK und SIEBERT (1927) war im zugänglichen Schrifttum nur eine derartige vergleichende Untersuchung beim Menschen zu finden, nämlich die von ATKINSON und IVY (1938). Diese haben den sekretionshemmenden Effekt einer Reihe von verschiedenen sekretionsbeschränkenden Pharmaka, unter diesen auch Atropin, Bellafolin, Novatropin (Homatropinmethylnitrat) und Methatropin (Atropinmethylnitrat), verglichen. Bei Hunden mit Blindsack und ebenso bei Ulcuspatienten verwendeten sie teils Probemahlzeit, teils Histamininjektionen in der Dosis  $\frac{1}{2}$  mg als sekretionsauslösendes Mittel. Der Gebrauch des Histamins gründet sich auf eine Untersuchung von GRAY (1937), welcher an Hunden nachgewiesen hat, dass Atropin einen begrenzten, aber sicheren Antagonismus gegen Histamin erkennen lässt, sowie dass die durch Atropin verursachte Hemmung desto geringer ist, je grösser die verabreichte Histamindosis war. Der Sachverhalt erinnert offenbar in nicht geringem Grade an den Antagonismus zwischen Pilocarpin und Atropin. Auf diese Analogie und deren eventuelle Bedeutung kommt Verf. im folgenden zurück. GRAY macht ferner geltend, dass Atropin, obgleich es die Sekretion der intestinalen Digestionsphase (Phase III) vollständig zu hemmen vermag, eine gleichgrosse, durch wiederholte Histamininjektionen ausgelöste Sekretion nur in beschränktem Umfang beeinflussen kann. Dies veranlasst G. unter Hinweis auf IVY, LIM und MCCARTHY (1925) zu der Schlussfolgerung, dass das Histamin entweder nicht das spezifische Sekretionshormon für den Magen ist, oder dass das Atropin die Bildung desselben im Verlauf der Verdauung hindern kann.

ATKINSON und IVY (1938) fanden bei ihren obenerwähnten Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Anticholinergica

auf die Magensaftsekretion, dass sowohl 1 mg Atropin wie 2 ml Bellafolin (1 mg linksdrehende Alkaloide enthaltend) bei Hunden mit Blindsack die durch Histamin hervorgerufene Sekretion während einer Zweistundenperiode um etwa 50 % herabsetzten. Die Azidität wurde nur wenig reduziert, während die Quantität der gesamten Säureproduktion auf ca.  $\frac{1}{3}$  der normalerweise nach Histamingabe erfolgenden sank. Beim Vergleich der Effekte von Atropin und Novatropin erhielten die Autoren bei Blindsackversuchen mit Histamin die Verhältniszahl  $2\frac{1}{2} : 2$  und nach Probemahlzeit die Relation  $5 : 2$ . In der späteren Versuchsreihe wurden die Alkaloide unmittelbar nach der Mahlzeit injiziert. Die Sekretionshemmung war während einer Periode von 5 Stunden am ausgesprochensten, machte sich aber noch nach 8 Stunden bemerkbar. Schliesslich wurde bei 8 Fällen von Uleus duodeni ein Vergleich zwischen Atropin, Bellafolin, Novatropin und Methatropin angestellt. Die Sekretion wurde mit  $\frac{1}{2}$  mg Histamin ausgelöst. Die Substanzen wurden 50 Minuten vor dem Histamin in Dosen von 1 mg bzw. 2 ml, 2,5 mg und 10 mg gegeben, die drei erstgenannten als Injektion, das Methatropin per os. Der Magensaft wurde alle 10 Minuten ausgehebert. Man erhielt keine Beeinflussung der Azidität, aber die Sekretmenge nahm während einer Zweistundenperiode deutlich ab. Das Atropin erwies sich hierbei als ebenso wirksam wie die übrigen Drogen. Sämtliche Mittel hatten in sicher sekretionshemmenden Dosen die unerwünschten Nebenwirkungen in Form von Trockenheit und Schstörungen. Infolgedessen machen ATKINSON und IVY geltend, dass sie es nicht für möglich halten, mit irgendeinem Belladonnaderivat eine für therapeutischen Gebrauch befriedigende Reduktion der Magensaftsekretion beim Menschen zu erzielen, ohne dass gleichzeitig die unerwünschten Nebenwirkungen aufträten. Dass die durch Histamin ausgelöste Sekretion wirklich von Anticholinergica gehemmt werden kann, veranlasste die Autoren zu der Schlussfolgerung, dass die Atropinderivate neben dem anticholinergischen Effekt einen zellulären Angriffspunkt in den Drüsen haben müssen. Da indessen das Zentralnervensystem beim Menschen atropinempfindlicher ist als die Magendrüsen, stellen sich toxische Symptome ein, bevor die Sekretionshemmung hochgradig wird.

Über einige weitere quantitative Untersuchungen hinsichtlich der Wirkung verschiedener Anticholinergica im Tierversuch sei hier noch in Kürze berichtet:

PEWSNER (1906) glaubte beim Hund zeigen zu können, dass Euphthalmin in einer Dosis von 4—5 mg pro kg Körpergewicht eine sekretionshemmende Wirkung von der Klasse des Atropins hatte. Sowohl die gesunde wie die hypersezernierende Schleimhaut liess sich beeinflussen, und die Sekretionsverminderung betrug ea. 50 %.

TENNENBAUM (1930) verglich den Effekt von Atropin und Homatropinmethylnitrat sowie Homatropin und fand, dass die beiden letzteren bei Blindsackversuchen am Hundemagen ungefähr  $\frac{1}{10}$  der sekretionshemmenden Wirkung des Atropins besaßen.

## b) Eigene Untersuchungen.

### 1. Methodik.

Die Magensaftsekretion ist bei der vorliegenden Untersuchung mit Histaminhydrochlorid in der Dosis 0,1 mg pro 10 kg Körpergewicht subkutan ausgelöst worden. Die Voraussetzung für die Brauchbarkeit des Histamins zu vergleichenden Untersuchungen beruht selbstverständlich auf der quantitativen Reproduzierbarkeit der hervorgerufenen Sekretion. Dies ist in bezug auf den Effekt des Histamins auf die Magensaftsekretion nach u. a. POLLAND (1930) und PORTER (1932) nachgewiesen.

Eine Kontrolluntersuchung dieses Verhaltens bei Versuchsperson Ö. ergab bei zwei verschiedenen Gelegenheiten mit 24 Stunden Intervall eine durch Histamin ausgelöste Sekretion während 60 Minuten nach der Injektion von 94,0 bzw. 98,5 ml. Es wäre natürlich erwünscht gewesen, das Histamin in einer intravenösen Dauertropfinfusion zuzuführen. Die Beeinflussung des Kreislaufs durch Histamin liess es jedoch Verf. nicht ratsam erscheinen, routinemässig in dieser Weise vorzugehen. Insulin fand bei dieser Untersuchung nicht als sekretionsauslösendes Mittel Verwendung, und zwar in erster Linie mangelnder Kenntnisse über die Reproduzierbarkeit seiner Wirkung wegen. Infolge des indirekten Charakters der Insulinreizung gestalten sich die Bedingungen für eine

quantitative Reproduzierbarkeit von Mal zu Mal wahrscheinlich weniger günstig.

Die Untersuchungen wurden an einer Anzahl von Krankenhauspatienten ausgeführt, bei deren Auswahl besondere Rücksicht darauf genommen wurde, dass verschiedene Grade der ausgelösten Sekretion vertreten wären. Es handelt sich fast ausschliesslich um Patientinnen; zur Hälfte hatten sie kein Magenleiden, der Rest bestand aus Ulcus- und Gastritisfällen. Im Hinblick auf die — wenigstens im Tierversuch — drohende Gefahr der Entstehung von Ulzerationen der Magenschleimhaut unter dem Einfluss des durch Histamin ausgelösten Magensafts wurden keine Fälle von Uleus ventriculi untersucht, sondern nur solche von Zwölffingerdarmgeschwür.

Die Methodik zur Ausheberung des Sekrets entspricht hauptsächlich der von IHRE (1938) angegebenen. So wurde die von LAGERLÖF und ÅGREN konstruierte Doppelsonde verwendet. Die Magenmündungen derselben sind in Übereinstimmung mit der IHREschen Vorschrift wesentlich erweitert worden. Kontinuierliche Absaugung (35 mm Hg) wurde angewendet. Der Speichel wurde meistens durch Ausspeien bei geeigneter Kopfhaltung (Vorwärtsbugen und scitliche Drehung) entfernt. Vor der Histamininjektion war die Absaugvorrichtung während 20—30 Minuten eingeschaltet, damit etwa vorhandener Mageninhalt beim Beginn der Sekretion sicher beseitigt wäre. Dieses Verfahren bildete auch in gewissem Grade eine Kontrolle dafür, dass die Patienten keinen Speichel verschluckt hatten.

Als sekretionshemmendes Mittel fand hier nur Atropinsulfat Verwendung, da ein genügend grosses Material zur sicheren Beurteilung der sekretionshemmenden Eigenschaften mehrerer Anticholinergiea in bezug auf den Magensaft in diesem Zusammenhang nicht zur Verfügung stand. Das Atropinsulfat wurde regelmässig 30 Minuten vor dem Histamin injiziert. Der durch Histamin hervorgerufene Magensaft wurde in Zehnminutenperioden im Laufe von 60 Minuten nach der Injektion gesammelt. Die Quantität wurde in ml angegeben, die Azidität durch Titrieren in der üblichen Weise mit  $n/10$  NaOH und Dimethylamidoazobenzol sowie Phenolphthalein als Indikatoren festgestellt. Der Chloridgehalt wurde elektrometrisch nach Müller bestimmt. Der metho-

diese Fehler überstieg für die Aziditätsbestimmungen nicht 5 %, für die Chloridbestimmungen nicht 2 %.

Für jede untersuchte Patientin wurde einerseits eine Normalkurve nach Histamininjektion und andererseits eine Kurve aufgezeichnet, bei der vor der Histamininjektion Atropinisierung erfolgt war. Hinsichtlich der zeitlichen Aufeinanderfolge der beiden Versuche sei angegeben, dass in etwa der Hälfte der Fälle der Histaminversuch ohne Atropinisierung zuerst vorgenommen wurde, bei den übrigen Fällen war die Reihenfolge umgekehrt. Die Dosis war 0,2 mg Atropinsulfat pro 10 kg Körpergewicht. In zwei Fällen wurde ausserdem noch ein Atropinversuch mit 0,33 mg pro 10 kg Körpergewicht ausgeführt. Der Zeitabstand zwischen zwei Untersuchungen hat bei ein und derselben Patientin eine Woche nicht überschritten, und in der Zwischenzeit sind keine Veränderungen des Gesundheitszustands oder in anderer wesentlicher Beziehung eingetreten. Sekretionshemmende Mittel wurden selbstverständlich, ausser bei den Atropinversuchen, nicht gegeben.

## 2. Resultate.

Die Hauptresultate sind auszugsweise in Tab. 19 angegeben, welche 8 Patienten enthält; von diesen waren Fall 1, 2, 4 und 5 nicht magenleidend, bei Fall 3, 6 und 7 handelte es sich um Ulcus duodeni und bei Fall 8 um eine Gastritis mit starker Hypersekretion. Die Fälle sind nach steigender Sekretion auf Histamin geordnet. Die Aziditäts- und Chloridwerte sind Mittel aus je 4 Zehnminutenperioden zwischen 20 und 60 Minuten nach der Histamininjektion. Die beiden ersten Magensaftportionen wurden bei dieser Berechnung des Mittelwerts unberücksichtigt gelassen, da dieselben in diesem Material wie gewöhnlich niedrige Aziditäts- und Chloridwerte aufweisen, was u. a. mit der starken Verdünnung zusammenhängt, welche der mechanisch ausgespülte Schleim der Drüsenausführungsgänge im Beginn der Sekretionsphase verursacht. Auf der anderen Seite haben Azidität und Chloridgehalt während der Zeit von 20—60 Minuten nach der Histamininjektion freilich kein konstantes Niveau, sondern lassen in der Regel eine steigende Tendenz erkennen. Die Unterschiede sind indessen nicht von erheblicher Grössenordnung.



Tabelle 19.

Magensaftsekretion bei einigen Patienten nach subkutaner Injektion von 0,1 mg Histaminhydrochlorid pro 10 kg Körpergewicht ohne und mit vorangehender Hemmung durch 0,2 mg Atropinsulfat pro 10 kg Körpergewicht subkutan. Sekretmengen in ml, Azidität und Chlorid in mM pro Liter.

Fall Nr.	Journal Nr.	Alter und Geschlecht	Durch Histamin ausgelöste, ungenährte Sekretion während 60 Min.	Mittlere Azidität 20—60 Min. nach der Histamininjektion		Mittlere Chloridkonz. 20—60 Min. nach der Histamininjektion	Gesamtmenge HCl während 60 Min. in mg	Durch Histamin ausgelöste, ungenährte Sekretion während 60 Min.	Mittlere Azidität 20—60 Min. nach der Histamininjektion		Mittlere Chloridkonz. 20—60 Min. nach der Histamininjektion	Gesamtmenge HCl während 60 Min.	Sekretionshemmung in %	Hemmung von HClproduktion in %
				Frei	Total				Frei	Total				
1	M.1822/41	65 ♀	61,0	113,7	122,8	161,2	310	44,0	124,2	134,0	159,0	252	28	19
2	M.1643/41	54 ♀	83,5	107,0	118,8	159,0	288	55,5	120,8	130,0	155,5	239	22	17
3	M.1922/41	32 ♀	134,0	92,5	101,8	144,5	429	67,0	106,5	114,0	136,8	200	50	51
4	M.1726/41	31 ♀	161,5	84,8	98,0	134,5	482	64,0	130,0	140,0	161,2	298	60	37
5	M.1421/41	40 ♀	183,0	113,5	125,0	—	676	106,0	112,5	122,3	—	405	42	40
6	M. 143/42	40 ♀	200,0	55,5	66,8	169,5	538	86,5	101,0	110,8	119,3	302	57	43
7	M.1633/41	27 ♂	202,5	102,0	112,8	158,3	746	88,0	127,5	136,8	146,5	398	56	44
8	M.1931/41	34 ♀	398,0	106,0	117,0	160,5	1547	160,0	126,0	136,0	171,0	742	60	52

Was zunächst die Sekretionsquantitäten betrifft, so zeigen die Atropinversuche durchweg den Normalversuchen gegenüber eine Verminderung.\* Diese Sekretionshemmung scheint derartig zu sein, dass grössere Sekretionsgeschwindigkeiten relativ mehr beeinflusst werden als kleinere. Besonders markant ist der Unterschied zwischen denjenigen Fällen, welche in den Normalversuchen weniger als 100 ml pro Stunde absondern, und den übrigen, die jedoch bedeutende Variationen aufweisen. Die Tendenz ist indessen unzweideutig und spricht dafür, dass die von Histamin hervorgerufene Magensekretion um so atropinempfindlicher ist, je grösser ihre Geschwindigkeit ist. Es wurde auch ein Versuch gemacht, die absoluten Salzsäuremengen in mg ohne und mit Atropinisierung zu berechnen. Dass diese Berechnung, welcher die Aziditätszahlen zugrunde liegen, mit Fehlerquellen behaftet ist, liegt auf der Hand. Die Resultate scheinen zu ergeben, dass die Verringerung der Quantität des Sekrets in der Regel grösser ist als die Herabsetzung der Salzsäureproduktion. Dies steht im Einklang mit dem bekannten und namentlich von BASTEDO (1936) betonten Sachverhalt, dass sich die Schleimsekretion verhältnismässig leichter hemmen lässt als die Salzsäurerzeugung. Die Schleimabsonderung ist neben der HCl-Produktion die einzige Sekretion von solcher Grössenordnung, dass sie als die Aziditätsverhältnisse nennenswert beeinflussender Faktor in Betracht kommen kann. Unter normalen Verhältnissen spielt dieselbe in Tierversuchen nach TEORELL (1933) als aziditätssenkendes Moment keine besondere Rolle, aber unter pathologischen Umständen kann es sich selbstverständlich anders verhalten. Die Chloride zeigen im vorliegenden Material meistens eine Tendenz zu Verminderung in den Atropinversuchen im Vergleich zu den Normalversuchen.

Die stärkere Hemmung, welche das Atropin auf grössere Sekretionsgeschwindigkeiten ausübt, wird am besten durch Beispiele aus einzelnen Sekretionskurven beleuchtet. Die Histaminsekretion nach subkutaner Injektion zeigt in ungedämpftem Zustand oft eine Kurve von gleicher Art wie z. B. die Speichelkurven nach Pilocarpin, d. h. den wohlbekannten Typ mit verhältnismässig rasch erreichtem und markantem Maximum, auf welches ein lang-

\* Die aus dem Duodenum erhaltenen Sekretmengen zeigten auch in den Atropinversuchen stets beträchtliche Verminderung.

sames Absinken folgt. Eine Stunde nach einer Histamindosis von 0,1 mg pro 10 kg Körpergewicht hat die Absonderung in der Regel erheblich nachgelassen, aber nicht völlig aufgehört. Fall 8, der eine höchst beträchtliche Sekretionsgeschwindigkeit aufwies, lieferte somit während der zweiten Zehnminutenperiode nach der Histamininjektion 173,0 ml Magensaft. In dem entsprechenden Zeitabschnitt nach Atropinisierung erhielt man 26,5 ml. Die Erscheinung ist qualitativ durchgängig und steht völlig in Analogie mit den bei den Speicheluntersuchungen erzielten Kurven. Das Atropin schneidet den Gipfel ab und verschiebt oft das Sekretionsmaximum. Bei dem angeführten Fall 8 wurden während der dritten Zehnminutenperiode im Normalversuch 83,5 ml und nach Atropinisierung 37,0 ml abgesondert, d. h. mehr als im zweiten Zeitabschnitt des Atropinversuchs.

Aus Tab. 19 geht indessen nicht nur hervor, dass die Sekretionsquantitäten von der Atropinisierung beeinflusst werden, sondern es ergibt sich auch, dass sich die Aziditätsverhältnisse praktisch regelmässig in bemerkenswerter Weise ändern. Sowohl freie HCl wie Gesamtazidität zeigen in den Atropinversuchen eine markante Steigerung den Normalversuchen gegenüber. Diese Veränderung muss auf eine oder andere Art der Atropinwirkung auf den Magen zugeschrieben werden. Die Chloridwerte der Normalversuche sind nämlich solche, dass der Effekt nicht ausschliesslich der durch das Atropin verursachten Hemmung der Speichelsekretion zur Last gelegt werden kann. Es kann sich mit anderen Worten nicht um die Eliminierung einer von verschlucktem Speichel herrührenden Verdünnung des Magensafts handeln. Hiergegen gewähren die Versuchsbedingungen ausreichende Garantien. Es kann dagegen eine Hemmung der Schleimsekretion, zumindest bei mehreren der Fälle, eine wesentlich beitragende Ursache für die nach Atropinisierung gefundene Aziditätssteigerung darstellen. Ein anderer, die Azidität betreffender Umstand muss hier noch gestreift werden. TEORELL (1933) hat nachgewiesen und IHRE (1938) fernerhin demonstriert, dass zwischen Azidität und Sekretionsgeschwindigkeit eine Beziehung besteht. In den gedämpften Versuchen, welche hier wiedergegeben werden, weist diese Relation mitunter eine markante Verschiebung auf. Während TEORELL und IHRE beobachtet hatten, dass eine grosse Sekretionsgeschwindigkeit eine hohe Azi-

dität des Sekrets mit sich bringt und vice versa, lässt sich bei den Atropinversuchen nicht selten eine Verschiebung und Auflockerung dieses Zusammenhangs in dem Sinne konstatieren, dass hohe Aziditätszahlen auch bei niedrigen Sekretionsgeschwindigkeiten erhalten werden. Die Erscheinung ist paradox, da es für ein kleines Sekretquantum schwerer sein muss, seine Azidität zu bewahren, als für ein grösseres. Ob das beobachtete Verhalten vorwiegend der Herabsetzung der Schleimsekretion oder Motilität zuzuschreiben ist, oder ob daneben die Ausheberungstechnik die Schuld trägt, lässt sich nicht mit Sicherheit entscheiden.

Die generellen Erklärungsmöglichkeiten für die gemachten Beobachtungen, welche sich zunächst darbieten, sind von dreierlei Art und gehen sämtlich, direkt oder indirekt, auf Wirkungen des Atropins zurück. Die Reihenfolge, in welcher sie hier behandelt werden, bedeutet keinen Versuch einer Graduierung ihrer Bedeutung.

1. Motilitäts- und Tonusveränderungen innerhalb des Magens.
2. Änderung der normalen Diffusionsverhältnisse durch Beeinflussung der Durchblutung und Permeabilität der Magenschleimhaut.
3. Änderung der Sekretionsgeschwindigkeit nach Histamininjektion, entweder durch einen spezifischen Antagonismus zwischen Atropin und Histamin in bezug auf die sezernierenden Elemente, oder durch Einwirkung des Atropins auf die Blutversorgung der Drüsen.

1. Der Einfluss des Atropins auf die Motilität und den Tonus des Magens ist der Gegenstand äusserst weitreichender Untersuchungen gewesen, auf welche hier nicht im einzelnen eingegangen werden kann. Im grossen ganzen herrscht Einigkeit darüber, dass Atropin in grossen Dosen sowohl Tonus wie Motilität hemmt. HERRIN (1936) betont besonders, dass Atropin die initiale Leerung des Magens verzögert. Um die Verhältnisse bei den hier angewandten Atropindosen zu beleuchten, wurde bei drei gesunden, jüngeren Versuchspersonen der Magen in unmittelbarem Anschluss an das Verschlucken von 125 g Kontrastbrei röntgenphotographiert, und zwar einmal unter normalen Bedingungen, sodann ca. 45 Minuten nach subkutaner Injektion von 0,2 mg Atropinsulfat pro 10 kg Körpergewicht. Die Resultate sind eindeutig. In

sämtlichen Fällen wurde nach der Atropinisierung ein geringerer Kontraktionsgrad der Magenwand um die Kontrastmasse beobachtet, welche nicht ebenso schnell in den Zwölffingerdarm übertrat wie bei den Normalversuchen. Eine markante Senkung des atropinisierten Magens war namentlich bei der Versuchsperson Ö. zu sehen; diesbezügliche Bilder folgen hier (siehe Fig. 10 und 11).

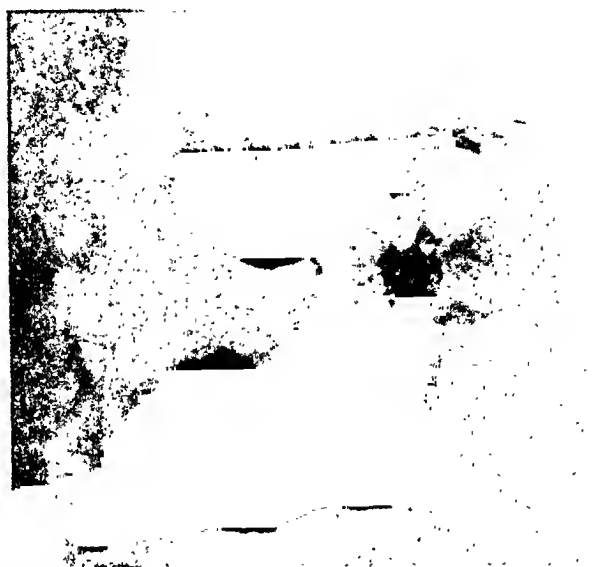


Fig. 10. Magen bei Versuchsperson Ö. unmittelbar nach Einnahme von 125 gm Kontrastbrei. Aufnahme im Stehen.

In TEORELLS (1933) Theorie über die Austauschdiffusion als Hauptursache der raschen Verminderung der hohen Primäraazidität des Magensafts, welche nach TEORELLS Berechnungen nahezu 200 mM/Liter beträgt, wird der Magenmotilität eine wichtige Rolle zugeschrieben. Der Diffusionsprozess, durch welchen die Wasserstoffionen auf dem Wege über die Mucosa verschwinden und von Alkaliionen ersetzt werden, wird von dem Umrühren gefördert, das eine normale Motilität bewirkt. Da das Atropin grundsätzlich zu einer Herabsetzung der Motilität führt, dürfte dasselbe also auf die Primäraazidität des Magensekrets konservierend wirken. Bei der angewandten Technik mit kontinuierlichem Aufsaugen des Sekrets lässt sich freilich nicht entscheiden, in welchem Umfang dieser Faktor Zeit findet, sich geltend zu machen. Der Umstand, dass man mit dieser Methodik in Normalversuchen

selten höhere Aziditätszahlen als etwa 150 mM/Liter erreicht, macht jedoch ersichtlich, dass die Austauschdiffusion der Wasserstoffionen auch bei kontinuierlicher Aufsaugung des Sekrets ihre Wirkung in hohem Masse entfalten kann. Die Reduktion der Primärazidität bis unter 150 mM/Liter ist nämlich in normalen Magen mit Sicherheit nicht ein Resultat der Verdünnung durch

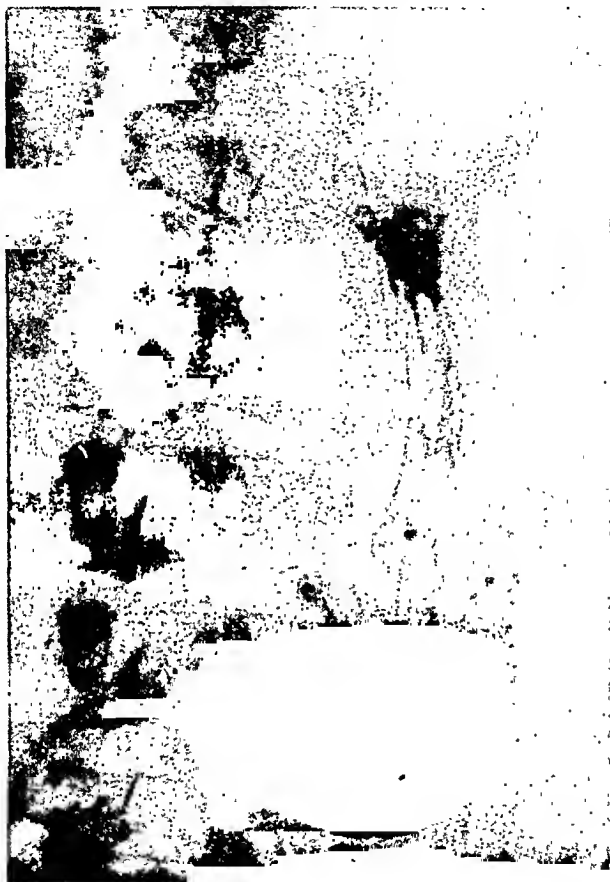


Fig. 11. Magen bei Versuchsperson Ö. unmittelbar nach Einnahme von 125 gm Kontrastbrei. 45 Min. vorher wurden 0,2 mg Atropinsulfat pro 10 kg Körpergewicht subkutan verabreicht. Aufnahme im Stehen.

Schleim. Nach TEORELL spielt die Schleimsekretion, wie oben angegeben, bei hohen Sekretionsgeschwindigkeiten im Vergleich zur Diffusion praktisch keine Rolle als aziditätssenkender Faktor. Selbstverständlich können die Dinge bei Gastritiden und Ulcera mit besonders reichlicher Schleimproduktion sowie bei älteren In-

dividuen anders liegen, was auch von beispielsweise Fall 3 und 6 in Tab. 19 deutlich illustriert wird. Beim vorliegenden Material dürfte die Schleimproduktion im Durchschnitt grösser sein als in einem Normalmaterial. Man kann aber auch als plausibel erachten, dass durch eine herabgesetzte Motilität während der Passage der Sekrettröpfchen aus den Fornixdrüsen zum Magengrund hinab die Möglichkeiten für eine Beeinflussung des Diffusionsprozesses in der angegebenen Richtung geschaffen werden.

Der Faltungsgrad der Magenschleimhaut, ebenfalls ein motorisches Phänomen, spielt nach TEORELL auch eine für den Diffusionsprozess wichtige Rolle. Ob dieser Faktor während der Atropinwirkung von Bedeutung ist, lässt sich schwerer entscheiden. Zwar weist der Magen, wie aus Fig. 11 ersichtlich wird, manchmal einen erheblich verringerten Tonus auf, ob sich aber diese Veränderung bis auf die Dicke und Anordnung der Mucosafalten erstreckt, ist schwer zu sagen. Die Röntgenbilder liefern jedenfalls keine Anhaltspunkte für wesentliche Veränderungen des Schleimhautreliefs bei den hier verwendeten Atropindosen. Der Tonusverlust kann indessen auf andere Weise die Versuchsergebnisse bei der angewandten Methodik beeinflussen. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Doppelsonde in einem atonisch herabhängenden Magen eine solche Lage einnimmt, dass die Aufsaugung des Sekrets durch Entstehung ausserhalb der Reichweite der Sonde liegender Sekretansammlungen am Grunde der Sinus erschwert wird. Es ist sogar denkbar, dass sich dieses Moment infolge der verhältnismässigen Unnachgiebigkeit der Doppelsonde auch im Normalversuch geltend macht. Welche Rolle dasselbe im Einzelfall spielen kann, lässt sich nur durch röntgenologische Bestimmung der Sondenlage mit Sicherheit entscheiden.

2. Das Atropin kann ferner durch Änderung der Durchblutung der Magenschleimhaut und der Permeabilitätsbedingungen im übrigen auf die Diffusionsverhältnisse Einfluss ausüben. Eine sichere Kenntnis der Atropinwirkung auf die Blutzirkulation des Magens liegt nicht vor und ist sicherlich durch Beobachtungen am Menschen nicht zu erreichen. Eine verminderte Durchblutung müsste aziditätsbewahrend wirken. Die Frage hängt in diesem Punkte mit der Bedeutung der Durchblutung für die Sekretion eng zusammen.

3. Die nach Atropinisierung beobachtete Veränderung der durch Histamin ausgelösten Sekretion besteht, wie oben angegeben wurde, allem Anschein nach in einer relativ stärkeren Wirkung bei höheren Sekretionsgeschwindigkeiten als bei niedrigeren. Ferner deuten die hier beschriebenen Versuche an, dass die Salzsäureproduktion verhältnismässig weniger beeinflusst würde als die Schleimabsonderung. Die Abnahme der Schleimsekretion lässt sich oft schon bei blosser Betrachtung des Sekrets deutlich konstatieren, welches nach Atropinisierung durchweg eine geringere Beimengung von Schleimflocken und -fäden aufweist. Besonders deutlich sieht man dies natürlich bei Fällen mit pathologisch gesteigerter Schleimsekretion, im vorliegenden Material z. B. bei Fall 4 und 6. Hier kann man aus den Aziditätszahlen herauslesen, dass ein aziditätsreduzierender Faktor, der sehr ins Gewicht fällt, durch die Atropinisierung ausgeschaltet worden ist.

Was die grundsätzliche Wirkung des Atropins auf die Sekretion nach Histaminreizung anlangt, so können verschiedene Alternative aufgestellt werden. Da hier nur Histamin als Reizmittel verwendet wurde, lässt sich die Frage nicht behandeln, ohne dass das Problem eines eventuellen spezifischen Antagonismus zwischen Atropin und Histamin berührt würde. KEETON, LUCKHARDT und KOCH (1920) haben auf Grund ihrer oben besprochenen Untersuchungen behauptet, dass ein reziproker Antagonismus zwischen Atropin und Histamin in bezug auf die Magensekretion wirklich vorliegt. Sie konnten aber bei Hunden feststellen, dass nicht einmal 21 mg Atropin genügten, um die Wirkung von 0,5 mg Histamin völlig aufzuheben. Versuche einer Berechnung der diesbezüglichen quantitativen Verhältnisse fehlen im zugänglichen Schrifttum sonst fast gänzlich. Die einzigen Angaben von Wert, welche zu finden waren, stammen von LEE und KIM (1937), die bei Blindsackversuchen am Hund konstatierten, dass 0,1—0,2 mg Histamin bei intakten Vagi von 1 mg Atropin aufgewogen wurden, während die Relation nach Vagotomie auf 0,03 : 1 bestimmt wurde.

Eine wichtige Frage ist nun, ob diese „Neutralisation“ zwischen Atropin und Histamin in bezug auf die Magensekretion auf dem Wege über Rezeptoren der Drüsenzellen erfolgt, in Analogie mit dem Sachverhalt beim z. B. Atropin-Azetylcholin- oder Atropin-Pilokarpinantagonismus, oder ob der Mechanismus ein anderer



ist; es handelt sich hierbei in erster Linie um eine Frage der Blutversorgung des Drüsenparenchyms. Liegt ein wirklicher, spezifischer, an Rezeptoren des Drüsenparenchyms angreifender Antagonismus vom Atropin-Azetylcholin- oder Atropin-Pilokarpintyp vor, was am plausibelsten erscheint, so muss dieser Antagonismus denjenigen Gesetzen folgen, welche für antagonistische Vorgänge im Bereich anderer Funktionen gelten.

Um dieses Problem zu beleuchten, wurde an zwei Patientinnen (Fall 5 und 6 in Tab. 19) ein weiterer Atropinversuch mit grösserer Dosis (0,33 mg pro 10 kg Körpergewicht) ausgeführt. Die Resultate sind in Tab. 20 wiedergegeben.

Tabelle 20.

*Von Histaminhydrochlorid (0,1 mg pro 10 kg Körpergewicht subkutan) ausgelöste Magensaftsekretion, mit steigenden Atropinsulfatdosen gehemmt.*

Fall Nr.	Ungehemmte, von Histamin ausgelöste Sekretion in ml während 60 Min. nach der Injektion	Sekretmenge in ml nach vorhergehender Hemmung mit 0,20 mg Atropinsulfat pro 10 kg Körpergewicht	Sekretmenge in ml nach vorhergehender Hemmung mit 0,33 mg Atropinsulfat pro 10 kg Körpergewicht	Hemmungsfaktor $k = \log y:x$ ; $y$ = ungehemmte Sekretion pro 60 Min. und $x$ = mg Atropinsulfat pro 10 kg Kgw.
5	183,0	106,0	49,0	1,56
6	200,0	86,5	68,5	1,65

Es ergibt sich, dass die weitere Verminderung der durch Histamin hervorgerufenen Sekretion, zu welcher die grössere Atropindosis in beiden Fällen führt, kleiner ist, als man erwarten wurde, wenn eine lineare Beziehung zwischen Reizeffekt und Hemmung obwaltete. Die Resultate zeigen tatsächlich dasselbe wie frühere Feststellungen in dieser Arbeit, nämlich dass die höhere Funktionsintensität relativ atropinempfindlicher ist als die niedrigere. Wenn man die Kurven der beiden Fälle über die Beziehung zwischen Reizeffekt und Hemmung in dieselbe Form bringt wie die der Speichelkurven, findet man, dass der Verlauf auch hier von einer logarithmischen Funktion gut gedeckt wird. Eine Berechnung des in derselben Weise wie bei den Speicheluntersuchungen ermittelten Faktors  $k$  als Ausdruck der Neigung der Kurve macht für die

beiden Fälle mit gleichgrosser Sekretion eine gute Übereinstimmung ersichtlich, wie es aus Tab. 20 hervorgeht. Nimmt man an, dass der Antagonismus Atropin-Histamin den grundsätzlich gleichen Gesetzen folgt wie der Antagonismus Atropin-Pilokarpin, so ist alsbald offenbar, wie sich dieser Antagonismus zum Nachteil der Atropins auswirkt. Um zu einer quantitativen Auffassung zu gelangen, wurden auf analoge Weise wie bei den Speicheluntersuchungen auch die  $k$ -Faktoren der übrigen Fälle berechnet, mit Ausgangspunkt von dem einzigen Wert auf der Dämpfungskurve derselben und mittels graphischer Extrapolation. Das Verfahren ist mathematisch unter der Voraussetzung berechtigt, dass die Dosis der hemmenden Substanz direkt proportional zum Logarithmus der Sekretmenge während der ersten Stunde nach der Histamininjektion ist. Den Faktor  $k$  für sämtliche Fälle findet man in der hier folgenden Tab. 21.

Tabelle 21.

*Gehemmte Magensaftsekretion.  $k$ -Werte für sämtliche Fälle.*

Fall Nr.	Faktor $k$	Fall Nr.	Faktor $k$
1	0,76	5	1,56
2	0,88	6	1,65
3	1,58	7	1,92
4	1,77	8	1,85

Die Zusammenstellung veranschaulicht, dass die individuellen Dämpfungskurven um so steiler verlaufen, je höher die Ausgangssekretion ist, d. h. dass Atropin bei grösseren Sekretionsgeschwindigkeiten stärker hemmt als bei geringeren. Zu einem zahlenmässigen Ausdruck für die erforderlichen Gewichtsmengen Atropin und Histamin bei praktisch vollkommen ausgeglichenem Antagonismus gelangt man am besten, indem man von den beiden Fällen ausgeht, bei welchen mehrere Punkte auf den Dämpfungskurven bestimmt worden waren. In diesen Fällen löste 0,1 mg Histamin subkutan pro 10 kg Körpergewicht eine Sekretion während 60 Minuten von rund 200 ml aus. Um diese Sekretion auf 1 ml in 60 Minuten abzdämpfen, d. h. zur praktisch vollständigen Hemmung, würde man laut den obigen Berechnungen für die beiden

Fälle nicht weniger als 1,40—1,45 mg Atropinsulfat pro 10 kg Körpergewicht benötigen, wenn das Atropin subkutan 30 Minuten vor dem Histamin zugeführt wird. Bei den betreffenden Individuen mit einem Gewicht von ca. 60 kg entspricht das ungefähr 8,5—9 mg Atropinsulfat, woraus hervorgeht, wie sehr sich der Antagonismus zum Nachteil des Atropins auswirkt. Es sind also mehr als 14 Gewichtseinheiten Atropinsulfat nötig, um in dem angeführten Beispiel die Wirkung einer Gewichtseinheit Histaminhydrochlorid zu hemmen. Zum Vergleich sei an die Gewichtsverhältnisse beim Atropin-Pilokarpin-antagonismus erinnert, bei dem 1 Gewichtseinheit Atropin ca. 12,5 Gewichtseinheiten Pilokarpin aufwiegt. Die Relation Atropin-Histamin stimmt nicht ganz mit den von LEE und KIM (1937) gefundenen Werten überein, welche in Versuchen an Hunden mit intakten Vagi 5 : 1—10 : 1 und nach Vagotomie 33 : 1 waren (hier: 14 : 1).

Versuche, durch Prüfung an der Speichelsekretion beim Menschen direkte Vergleichszahlen zwischen Atropin-Pilokarpin- und Atropin-Histaminantagonismus zu erhalten, scheiterten daran, dass das Histamin eine sehr geringe speicheltreibende Wirkung hat. So gab bei Versuchsperson Ö. 0,1 mg Histamin subkutan pro 10 kg Körpergewicht während einer Stunde nur 2 g Speichel, wodurch direkte Vergleiche vereitelt werden.

Die lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der durch Histamin hervorgerufenen Magensekretion und der Menge hemmender Substanz, welche im vorangehenden wahrscheinlich geworden ist, erklärt eine bei früheren Untersuchungen ziemlich häufige Erfahrung, nämlich dass es verschiedenen Untersuchern laut Angabe oft gelungen ist, mit Atropin die von Histamin ausgelöste Sekretion um etwa 50 % zu hemmen. Die vermutete Beziehung erscheint insofern geeignet, eine Erklärung hierfür abzugeben, als eine Hemmung bis gegen 50 % so relativ leicht zu erzielen ist, während die zu weiteren Hemmungsgraden erforderlichen Atropinmengen beträchtlich steigen. Beim Menschen bringt dieser Umstand es in Wirklichkeit mit sich, dass man die von 0,1 mg Histamin pro 10 kg Körpergewicht in einem gewöhnlichen Magen hervorgerufene Sekretion mit Atropin überhaupt nicht einmal annähernd hemmen kann. Auf der anderen Seite aber hat die antagonistische Beziehung, wie sie hier vermutet wird, zur

Folge, dass es ziemlich leicht ist, schon mit mässigen Atropindosen (die freilich in der Nähe der Maximaldosis liegen) eine wesentliche Reduktion der Sekretmenge zu bewirken. Noch leichter lässt sich eine Hemmung bei hypersekretorischer Reaktion auf Histamin erzielen. Inwiefern dies für die normale, von der Nahrung ausgelöste Magensekretion zutrifft, lässt sich auf Grund hier vorliegender Beobachtungen nicht entscheiden. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist das jedoch der Fall. Die durch eine Mahlzeit provozierte Sekretion ist laut Angaben in normalen Fällen von ungefähr derselben Grössenordnung wie die Sekretion nach der hier angewandten Histamindosis. Die Frage, welche Schlussfolgerungen aus Untersuchungen mit Histamin als sekretionsauslösendem Mittel gezogen werden können, hängt letzten Endes mit dem Problem zusammen, ob das Histamin, wie heutzutage viele Forscher meinen, wirklich mit dem physiologischen Reizmittel identisch ist.

Es ist also dem Atropin als sekretionshemmendem Mittel eine auch für praktischen Gebrauch bedeutsame Rolle zuzubilligen, indem dasselbe, wenigstens bei hypersekretorischen Zuständen, in therapeutischen Dosen eine wesentliche Sekretionshemmung auszuüben vermag. Eine andere, praktisch wichtige Frage bleibt jedoch noch offen: ist die von Atropin wahrscheinlich u. a. sowohl durch starke Hemmung einer namentlich in pathologischen Fällen gesteigerten Schleimsekretion als auch durch Herabsetzung der Motilität verursachte „Konservierung“ der Azidität des Sekrets ein nützlicher oder schädlicher Faktor? Die Frage kann hier nicht mit Sicherheit beantwortet werden, aber von vielen Seiten ist auf die Gefahr einer Unterdrückung der Schleimsekretion hingewiesen worden (BASTEDO 1937, MÖLLER 1941).

### Zusammenfassung.

1. Die durch Histamin ausgelöste Magensaftsekretion, von der auf Grund der Erfahrungen anderer sowie eigener solcher angenommen wird, dass sie von Mal zu Mal quantitativ reproduzierbar ist, lässt sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen mit Atropinsulfat in sicher nachweisbarem Grade hemmen. Es macht

den Eindruck, als werde die Quantität mehr gehemmt als die gesamte HCl-Sekretion.

2. Die Hemmung, welche bei höheren Sekretionsgeschwindigkeiten relativ stärker ist als bei niedrigeren, ähnelt ihrem Typ nach derjenigen, welche, wie in dieser Arbeit zuvor gezeigt wurde, von Anticholinergien auf parasympathische Funktionen ausgeübt wird. Die Beziehung zwischen der Funktionsintensität und der Menge hemmender Substanz weist auch hier grosse Ähnlichkeit mit einer logarithmischen Funktion auf.

3. Die Aziditätsverhältnisse werden ebenfalls von Atropin in dem Sinne beeinflusst, dass sowohl freie HCl wie Gesamtazidität nach Histaminreizung bei vorliegendem Material in der Regel während der Atropinisierung höhere Werte zeigen als normalerweise. In diesem Material, welches zum grossen Teil eine pathologisch gesteigerte Schleimsekretion aufweist, wird die Aziditätssteigerung während der Atropinisierung wahrscheinlich in nicht geringem Grade durch eine relativ stärkere Hemmung der Schleimsekretion erklärt. Die Rolle, welche die Wirkung des Atropins auf Motilität, Permeabilität und Durchblutung als aziditätsregelnde Faktoren spielen kann, wird von der durch TEORELL nachgewiesenen Austauschdiffusion ausgehend erörtert.

4. Ein zahlenmässiger Ausdruck für den Antagonismus Atropin-Histamin wird auf Grund der Hemmungsgrade berechnet, die mit steigenden Atropindosen erzielt worden waren. Zu praktisch vollständigem Antagonismus würde unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine ca. 14mal so grosse Gewichtsmenge Atropin als Histamin erforderlich sein, woraus folgt, dass Atropin bei praktischem Gebrauche eine ebenso grosse und ebenso resistente Sekretion wie die von Histamin ausgelöste nicht gänzlich zu hemmen vermag. Dagegen können hohe Sekretionsgeschwindigkeiten durch therapeutisch anwendbare Atropindosen merkbar gehemmt werden.

### 8. Kapitel.

## Zusammenfassende Übersicht nebst Betrachtungen über den Zusammenhang zwischen chemischer Konstitution und Wirkungs- stärke anticholinergischer Substanzen.

Die in vorliegender Arbeit untersuchten parasymphathischen Organfunktionen liessen unter den gegebenen Versuchsbedingungen grundsätzliche Ähnlichkeiten bezüglich des Verhältnisses zwischen Reizung und Hemmung insofern erkennen, als sich eine hohe cholinergische Funktionsintensität als leichter hemmbar erwies als eine geringe solche. Dies gilt, wie gezeigt wurde, sowohl für natürliche wie künstliche Stimuli. Was die Speichelsekretion, welche mittels Pilocarpin hervorgerufen wurde, und die Kontraktion des Pupillensphinkters, die mit Licht ausgelöst wurde, angeht, so hat sich ergeben, dass sich der Zusammenhang zwischen Funktionsintensität und Hemmung durch eine logarithmische Beziehung gut ausdrücken lässt; dies bedeutet, dass der Logarithmus der Funktionsintensität zur Menge hemmender Substanz, welche bei diesen Versuchen regelmässig vor dem Reizmittel appliziert wurde, direkt proportional ist. Für die Ruhfrequenz des Herzens, ein Ergebnis des natürlichen Gleichgewichts zwischen Accelerans- und Vagusfunktion, gilt, wie nachgewiesen wurde, das prinzipiell gleiche Verhältnis. Eine durch hohen Vagustonus bedingte geringe Herzfrequenz hat sich im Einklang mit älteren Erfahrungen als empfindlicher gegen Anticholinergica erwiesen als eine grosse Frequenz. Die Art des Beobachtungsmaterials gestattet hier keine mathematische Bearbeitung von demselben Beweiswert wie bei der Speichelabsonderung und Pupillenreaktion, aber die grundsätzliche Übereinstimmung ist ausser allen Zweifel gestellt. Was die durch Histamin ausgelöste und mit

Atropin ghemmte Magensaftsekretion betrifft, so stellte sich heraus, dass die Beziehung mit grosser Wahrscheinlichkeit auch hier zutrifft. Wegen des ungünstigen Mengenverhältnisses zwischen Atropin und Histamin, welches zur Folge hat, dass hohe Hemmungsgrade Atropinmengen erfordern, die beträchtlich über den beim Menschen anwendbaren Atropindosen liegen, konnte der spätere Verlauf der Dämpfungskurve hier nicht verfolgt werden. Die initialen Kurvenbilder machen jedoch einen hohen Grad von Ähnlichkeit mit den Speicheldämpfungskurven ersichtlich, d. h. anscheinend eine direkte Proportionalität zwischen dem Logarithmus der Sekretionsintensität und der Quantität hemmender Substanz. Die angewandten Methoden und die nachgewiesene grundsätzliche Beziehung zwischen Funktion und Hemmung gestatten in bezug auf die Speichelsekretion und die Lichtreaktion des Pupillensphinkters eine recht genaue Bestimmung der relativen Stärke verschiedener anticholinergischer Substanzen, was unter praktisch-therapeutischen Gesichtspunkten von Wert ist.

Über die hier untersuchte Beziehung zwischen der Funktionsintensität und der Hemmung derselben bei cholinergischen Funktionen liegen im zugänglichen Schrifttum nur spärliche Angaben vor. Dagegen ist der Zusammenhang zwischen den molaren Konzentrationen des Azetylcholins und Atropins zur Erzielung einer Hemmung gewissen Grades an verschiedenen Organfunktionen eingehend untersucht worden. Die umfangreiche einschlägige Literatur ist bei CLARK (1937) abgehandelt. Die von CLARK und anderen aufgestellten quantitativen mathematischen Ausdrücke für die Wirkung des Azetylcholins und für den Antagonismus zwischen Atropin und Azetylcholin beziehen sich indessen auf molare Konzentrationen der Antagonisten in Versuchen an isolierten Organen und lassen sich daher nicht direkt auf den vorliegenden Zusammenhang übertragen.

Unter den Beobachtungen, welche die einschlägigen Fragestellungen unmittelbar berühren, ist die oben angeführte allgemein bekannte Feststellung, dass ein unter hohem Vagustonus arbeitendes Herz atropinempfindlicher ist als ein Herz mit höherer Schlagfrequenz. Ferner gibt VAN LIDTH DE JEUDE (1918) in einer Arbeit über den Antagonismus zwischen Atropin und Pilocarpin am isolierten Darm an, dass sich, obwohl zwar keine Proportiona-

lität zwischen Pilokarpinmenge und -konzentration sowie Atropinmenge und -konzentration nachgewiesen werden kann, doch das Verhalten konstatieren liess, dass bei stark steigenden Pilokarpinmengen die zur Aufhebung des Effekts erforderlichen Atropindosen nur langsam zunehmen. Schliesslich sei hier auf CUSHNYS (1914) aus Studien über den Atropin-Pilokarpinantagonismus bei der Speichelsekretion im Tierversuch gezogenen Schluss hingewiesen, dass der Antagonismus dem Gesetz der Massenwirkung folgt und sich nicht nach der Regel von den multiplen Proportionen vollzieht.

Die hinsichtlich der relativen Wirkungsstärke verschiedener anticholinergischer Substanzen auf verschiedene Funktionen erhaltenen Resultate ermöglichen einige Ergänzungen und Berichtigungen älterer Anschauungen. Zunächst kann prinzipiell bestätigt werden, dass, wie früher von mehreren Autoren hervorgehoben worden war, verschiedene Anticholinergica nicht denselben relativen Hemmungsgrad verschiedenen Funktionen gegenüber entfalten, sowie dass die einzelnen Funktionen verschieden resistent sind. Nach HENDERSON (1923) können verschiedene cholinergische Funktionen im Tierversuch von Atropin in folgender Ordnung mit steigender Schwierigkeit beeinflusst werden: Speichelabsonderung, Herzfrequenz, Pylorustonus, Dünndarmtonus, Harnblase, Pupillenfunktion, rhythmische und peristaltische Funktionen des Darms. Die allgemeine Reihenfolge, welche sich bei vorliegenden Versuchen am Menschen, teilweise unter Berücksichtigung subjektiver Empfindungen der Versuchspersonen, feststellen liess, stimmt mit HENDERSONS Angaben gut überein und sieht folgendermassen aus: Trockenheitsgefühl an der Mundschleimhaut und im Rachen (oft von einer trachealen Trockenheitsempfindung eingeleitet), Herzfrequenzsteigerung, Akkomodationsparese (regelmässig der merkbaren Mydriasis bei subkutaner Injektion des Atropins vorausgehend), Mydriasis, deutliche Hemmung der durch Histamin ausgelösten Magensaftsekretion. Die Skala, längs welcher diese Wirkungen laufen, liegt bei normalen Individuen für Atropinsulfat in subkutaner Injektion im grossen ganzen zwischen 0,05 und 0,2 mg pro 10 kg Körpergewicht.



Was die relative Wirkungsstärke verschiedener Anticholinergica betrifft, so wird in bezug auf Einzelheiten auf die besonderen Abschnitte verwiesen. Hier seien nur bedeutsamere Abweichungen von den im Schrifttum vertretenen Anschauungen rekapituliert. Das Skopolamin, über dessen relative Wirkungsstärke bisher keine sicheren Angaben vorgelegen hatten, erwies sich hinsichtlich seiner sowohl speichelhemmenden wie mydriatischen Wirkung als etwa 3mal so stark wie Atropinsulfat, während seine Unfähigkeit, in anwendbaren Dosen den Herzvagus zu beeinflussen, bestätigt werden konnte. Das l-Hyoseyamin wurde, wie aus theoretischen Gründen zu erwarten war, bei allen geprüften Funktionen als ungefähr doppelt so stark wie Atropin befunden. Dem Atropinmethylnitrat (Eumydrin) ist in der Literatur eine sehr wechselnde Wirkungsstärke bei cholinergischen Funktionen zugeschrieben worden. Während ältere Untersucher den mydriatischen Effekt desselben als etwas schwächer oder ebenso stark und von kürzerer Dauer als beim Atropin aufgefasst hatten, konnte hier festgestellt werden, dass das Mittel in dieser Beziehung das Atropin sicher übertrifft. ISSEKUTZ (1917) fand bei Tierversuchen, dass die pilokarpinantagonistische Wirkung desselben auf die Speichelsekretion die vierfache des Atropins war. Dies veranlasste CUSHNY (1920) zu einer Nachprüfung, welche ergab, dass das Atropinmethylnitrat den anderthalbfachen Effekt des Atropins besass. Hier liess sich für diese Relation der Wert 2:1 konstatieren, oder dieselbe Stärke, welche das l-Hyoseyamin aufweist. Was die Wirkung des Mittels auf den Herzvagus anlangt, so fand ISSEKUTZ (1917) beim Frosch einen 8mal so starken Effekt wie der des Atropins. Hier wurde beobachtet, dass die Herzvaguswirkung des Atropinmethylnitrats etwa die dreifache des Atropins ist. Dass die in allen hier berührten Beziehungen zweifelsohne überlegene Aktivität des Atropinmethylnitrats im Vergleich zum Atropin in grossem Umfang unbeachtet geblieben ist, geht u. a. daraus hervor, dass MÖLLER (1941) in seinem Lehrbuch das Eumydrin mit Rücksicht auf seine peripheren Wirkungen als 2—3mal so schwach wie das Atropin bezeichnet. Hierzu hat sicherlich der Umstand beigetragen, dass Eumydrin bei peroraler Zufuhr erheblich schwächere Wirkungen zu entfalten scheint

als bei Injektion. Sonst würde die hier und da als geeignet angegebene Dosierung „1—5 mg innerlich“ kaum zu erklären sein.

Auch die Toxizität des Atropinmethylnitrats, worunter im Schrifttum in der Regel die zentralen Wirkungen desselben zu verstehen sind, ist sehr verschieden beurteilt worden. BROWN und FRASER (1869), welche N-methylierte Atropinderivate zuerst dargestellt haben, schrieben diesen Verbindungen eine im Vergleich zur Stammverbindung wesentlich verringerte Toxizität zu. Andere Autoren wiederum waren der Ansicht, dieselben besäßen toxische Eigenschaften in höherem Grade. Heutzutage dürfte das Atropinmethylnitrat allgemein für weniger toxisch gehalten werden als Atropin, und zwar ganz besonders bei Berücksichtigung der stärkeren peripheren Wirkung desselben. Es wurde indessen noch 1940 von GRAHAM und LAZARUS geltend gemacht, dass die Toxizität des Atropinmethylnitrats, als tödliche Dosis bei intraperitonealer Applikation an Mäusen gemessen, die dreifache des Atropins sei. Was die übrigen hier gemachten Beobachtungen über die Stärkerelationen verschiedener Anticholinergica betrifft, so soll nur noch daran erinnert werden, dass Homatropinhydrobromid als speichelhemmendes Mittel ca.  $\frac{1}{25}$  und als Mydriaticum etwa  $\frac{1}{50}$  der Wirkung des Atropinsulfats hat. Dies im Verein mit der Erfahrung, dass gesunde Individuen ohne nennenswertes Unbehagen eine subkutane Injektion von rund 20 mg Homatropinhydrobromid vertragen, bewirkt, dass die offizinelle Maximaldosis von 1 mg unnötig klein erscheint.

Die vergleichende Stärkeprüfung verschiedener Anticholinergica hat sonst in grossen Zügen ergeben, dass erhebliche Veränderungen des Atropinmoleküls in der Regel auch eine beträchtliche Abschwächung der peripheren, anticholinergischen Wirkungen mit sich bringen. Als Pilocarpinantagonist auf die Speichelsekretion erreicht keins der neueren synthetischen Mittel einen höheren Wirkungsgrad als etwa  $\frac{1}{400}$  der Atropinstärke. Die mydriatischen Eigenschaften derselben sind in ähnlicher Weise reduziert.

Demgegenüber hat die N-Methylierung, wie beim Atropinmethylnitrat, eine markante Steigerung anticholinergischer Eigenschaften bei den geprüften Funktionen zur Folge. Der höchste Wirkungsgrad pro Gewichtseinheit, den unvergleichlich das Sko-

polamin aufweist, hat sich jedoch bisher nicht sicher übertreffen lassen.

Über die Frage des näheren Zusammenhangs zwischen chemischer Konstitution und Wirkungsstärke anticholinergischer Mittel, welche im Rahmen dieser Erörterungen grosses Interesse besitzt, mögen hier noch einige weitere Einzelheiten angeführt werden.

Man glaubte zunächst, dass die biologische Aktivität einer allgemeinen Regel folge, welche zu Unrecht LADENBURG zugeschrieben wurde. Nach dieser „Ladenburgschen Regel“ sollen Tropeine mydriatische Eigenschaften haben, wenn sie erstens einen Benzolkern und zweitens eine alkoholische Hydroxylgruppe in Seitenkettenbindung enthalten. Ausserdem hielt man die Aktivität für an das Vorkommen eines asymmetrischen Kohlenstoffatoms geknüpft, an welches eine Hydroxylgruppe gebunden worden war. Gleichartige Verbindungen ohne asymmetrisches Kohlenstoffatom wiesen eine Abschwächung der Wirkung bis  $\frac{1}{200}$ — $\frac{1}{300}$  derselben auf. JOWETT und PYMAN (1909) sowie PYMAN (1917) haben jedoch gezeigt, dass die Ladenburgsche Regel keine Geltung besitzt, indem man ohne Einbusse des mydriatischen Effekts sowohl den Benzolkern durch einen Pyridinkern ersetzen als auch die alkoholische Hydroxylgruppe beseitigen konnte. Die dabei erhaltenen Tropeine waren indessen als Mydriatica schwach. Nach CUSHNY (1926) soll der am meisten charakteristische Zug des Atropins zum Unterschied von schwächeren Tropeinen das Vorkommen einer alkoholischen Hydroxylgruppe in einer Seitenkette sein, die eine Karboxylgruppe enthält, ein Umstand, welcher oft molekulare Asymmetrie und optische Aktivität bedinge. Diese Züge in der Konstitution des Atropins können jedoch nach CUSHNY nicht die essentiellen sein, da sie auch bei anderen Gruppen als Hydroxylen vorhanden sein können. C. beschränkt sich aus diesem Grunde darauf, die Bedeutung der Hydroxylgruppe im allgemeinen zu betonen. Die Anwesenheit derselben steigert die Aktivität auf das 200—300fache, und die Stärke wird fernerhin verdoppelt, wenn das Molekül linksdrehend ist.

Es hat indessen den Ansehen, als ob diejenigen Veränderungen des Atropinmoleküls, welche am besten geeignet sind, die Aktivi-

tät zu erhöhen, in einer Umwandlung des Tropinstickstoffs und Methylierung desselben bestehen. Dass lediglich die Erhöhung der Wertigkeit des Stickstoffs nicht allein zu einer Zunahme der biologischen Aktivität führt, geht aus dem Beispiel des Atropin-N-Oxyds (Genatropin) hervor, in welchem der fünfwertige Stickstoff oxydiert ist, wodurch die Aktivität, mit der des Atropins verglichen, den hier angestellten Beobachtungen zufolge auf ca.  $\frac{1}{4}$  sinkt. Das Atropinmethylnitrat dagegen, mit methyliertem Stickstoff, weist eine unzweideutige Steigerung der anticholinergischen Eigenschaften auf.

Das Skopolamin, das stärkste der zur Zeit gebräuchlichen Anticholinergica, zeigt, dass die geringfügige Veränderung vom Tropin des Atropinmoleküls zum Skopin eine erhebliche Vermehrung der Aktivität zur Folge hat, welche bei gewissen Funktionen auf das Dreifache steigt. Die Herzvaguswirkung, ein bei therapeutischem Gebrauch in gewissem Masse unerwünschter Effekt, wird beträchtlich reduziert und lässt sich bei therapeutisch anwendbaren Dosen überhaupt nicht mit Sicherheit nachweisen.

Es liegt da recht nahe, sich zu fragen, welchen Effekt ein N-methyliertes Skopolamin besitzen würde. Obwohl das prinzipielle Verfahren bei der Darstellung von Brommethylen und -äthylaten von sowohl Tropeinen wie Skopoleinen schon 1902 von Merck patentiert worden war, liegen keine Nachrichten darüber vor, ob diese Derivate dargestellt und einer Prüfung unterworfen worden sind, bis auf folgende Stelle in der Patentschrift (DRP. 145 966): „Die Untersuchung der Bromide von ähnlichen Derivaten anderer Alkaloide der Tropein- und Scopoleingruppe hat weiter gezeigt, dass sich diese Verbindungen auch vor den ursprünglichen Alkaloiden vorteilhaft auszeichnen, indem ihnen die unerwünschten Nebenwirkungen entweder ganz fehlen oder wenigstens stark zurücktreten, während die geschätzten Eigenschaften der Pflanzenbasen ihnen erhalten bleiben.“ Ferner sagt FRÄNKEL (1921) in seiner Arbeit über Arzneimittelsynthesen: „Durch Einwirkung von Alkylbromid auf Atropin, Hyoscyamin, Homatropin, Scopolamin erhält man die entsprechenden bromwasserstoffsäuren Salze der quaternären Basen, denen die Gehirnwirkungen fehlen.“

Unsere Kenntnisse über die peripheren Wirkungen eines N-methylierten Skopolamins sind also gleich Null. Man kann jedoch sagen, dass ein Bedarf an starken sekretionshemmenden Substanzen besteht, insbesondere wenn man Mittel erhalten könnte, welche eine oder mehrere der obligaten Wirkungen abgehen, die die Mehrzahl der starken Anticholinergica in grösseren Dosen praktisch unanwendbar machen. Von einem N-methylierten Skopolamin würde man per analogiam mit dem Atropinmethylnitrat und in Übereinstimmung mit den Äusserungen in der Patentschrift und bei FRÄNKEL eine Herabsetzung der zentralen Wirkung erwarten können, welche beim Skopolamin ja das wesentliche Hindernis für die Ausnützung des starken sekretionshemmenden Effekts desselben darstellt. Ferner hat man Anlass zu der Vermutung, dass die Eliminierung oder zumindest erhebliche Einschränkung der Herzvaguswirkung, welche der Übergang vom Tropin zum Skopin bedeutet, bei einem N-methylierten Skopolamin beständig sein könnte. Dagegen dürfte man nicht mit beispielsweise einer selektiven Hemmung der Magensaftsekretion ohne gleichzeitige massive Speichelhemmung rechnen können.

Man kann mithin sagen, dass der Bedarf eines Mittels, das die Magensaftsekretion stärker als Atropin zu hemmen vermag und nicht wie das Atropinmethylnitrat bei peroraler Medikation einen sehr grossen Teil seiner Aktivität einzubüssen scheint (vgl. die Resultate bezüglich der Wirkung dieses Mittels auf die Magensaftsekretion, welche von ATKINSON und IVY mitgeteilt worden waren und auf S. 96 besprochen worden sind) aktuell ist.

Verf. hat deshalb versucht, ein N-methyliertes Skopolamin darzustellen. Die geringe Ausbeute gestattete weder hinreichende Prüfung noch eine Elementaranalyse oder Identitätsuntersuchung. Die vorläufige Untersuchungen an der Speichelsekretion beim Menschen schienen jedoch zu ergeben, dass das dargestellte Mittel einen pilokarpin antagonistischen Effekt hatte, der gleichstark wie oder noch stärker als der des Skopolaminhydrobromids war.

Um hierüber Klarheit zu erhalten, wurde die Darstellung von N-methylierten Skopolaminen einer anderen Instanz anvertraut.

Auf Ersuchen des Verf.s hat der Chefchemiker der AG. Pharmacia in Stockholm, Herr Ingenieur E. ASKELÖF, die Güte gehabt,

ein Skopolaminmethylobromid darzustellen, von dem Proben dem Verf. freundlichst zu Verfügung gestellt wurden. Die Untersuchungen hierüber sind gerade erst im Angriff genommen worden. Ein sehr starker pilokarpinantagonistischer Effekt auf die Speichelsekretion ist zweifelsohne erwiesen, wahrscheinlich gleichstark wie oder noch stärker als der des Skopolaminhydrobromids. Eine Dosis von 25—30  $\gamma$  pro 10 kg Körpergewicht bewirkte bei 5 jüngeren, männlichen Versuchspersonen eine sehr deutliche Trockenheit der Mundschleimhaut und der gesamten Haut. Die zentralen Wirkungen scheinen im Vergleich zu denen des Skopolaminhydrobromids in den Hintergrund zu treten. Die Herzvaguswirkung scheint gleichfalls schwach zu sein.

Ebenso verdient das von M. u. M. POLONOWSKI (1925) dargestellte Skopolamin-N-Oxyd (Genoskopolamin) eine eingehendere Prüfung in bezug auf seine — doch wahrscheinlich abgeschwächten — anticholinergischen Eigenschaften. Bisher beschränkte sich der Gebrauch desselben fast gänzlich auf seine Verwendung als Ersatzmittel bei der Behandlung von Folgezuständen nach Enzephalitiden und bei Kombinationsnarkosen. Das Mittel war leider im Laufe der hier ausgeführten Untersuchungen nicht erhältlich.

## Schrifttum.

- ADAMÜCK, A.: Zentralbl. med. Wissensch. 1870, 177, 292 und 721, zit. n. Pfankuch.
- ALBERTONI, P.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol. 1882, 15, 248.
- ALBERTONI, P. und MARCACCI, C.: Giorn. real. Accad. Torino 1884, zit. n. Pfankuch.
- v. ALDOR, L.: Ztschr. klin. Med. 1900, 40, 248.
- v. ANREP, B.: Arch. f. d. ges. Physiol. 1880, 21, 185.
- ARIMA, H.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol. 1918, 83, 1.
- ATKINSON, A. J. und IVY, A. C.: Am. J. Digest. Dis. 1938, 4, 811.
- AUER, J. und MELTZER, S. J.: Am. J. Physiol. 1906, 17, 143.
- BABKIN, B. P.: Die äussere Sekretion der Verdauungsdrüsen, Berlin 1928.
- LA BARRE, J. und DE CESPÉDÈS, C.: Compt. rend. Soc. de biol. 1931, 106, 1249.
- BASTEDO, W. A.: Am. J. M. Sc. 1920, 159, 53.
- BASTEDO, W. A.: J. A. M. A. 1936, 106, 85.
- BERNSTEIN, I. und DOGIEL, J.: Ztschr. ration. Med. 1866, 29 u. 35, zit. n. Pfankuch.
- v. BEZOLD und BLOEBAUM. Unters. physiol. Labor. Würzburg 1867, 1, 1, zit. n. Pfankuch.
- BINZ, C.: Vorlesungen über die Pharmacologie, 2 Aufl. Berlin 1891.
- v. BRAUN, J.: Ber. deutsch. chem. Ges. 1918, 51, 236.
- v. BRAUN, J., BRAUNSDORF, O. und RÄTH, K.: Ber. deutsch. chem. Ges. 1922, 55, 1666.
- v. BRAUN, J. und RÄTH, K.: Ber. deutsch. chem. Ges. 1920, 53, 601.
- BROWN, C. B. und FRASER, T.: Trans. Roy. Soc. Edinburgh 1869, 25, 693.
- CHALFEN, S. S.: Arch. f. Verdauungskr. 1928, 44, 250.
- CLARK, A. J.: Heffters Hdb. d. exper. Pharmacol. Ergänzungswerk 1937, 4, 1.
- CLOETTA, M.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol. 1911, 64, 426.
- CRAWFORD, M.: J. Pharmacol. a. exper. Therap. 1924, 22, 1.
- CROHN, B. B.: Am. J. M. Sc. 1918, 155, 801.
- CUSHNY, A. R.: J. Physiol. 1904, 30, 176.
- CUSHNY, A. R.: J. Pharmacol. a. Exper. Therap. 1914—15, 6, 539.
- CUSHNY, A. R.: J. Pharmacol. a. Exper. Therap. 1920, 15, 105.
- CUSHNY, A. R.: J. Pharmacol. a. Exper. Therap. 1926, 29, 5.

- CUSHNY, A. R. und PEEBLES, A. R.: J. Physiol. 1904—05, 32, 501.  
 CUSHNY, A. R., MARRIS, H. F. und SILBERBERG, J.: Heart 1912, 4, 33.  
 DALE, H. H.: J. Physiol. 1914, 6, 147.  
 DALE, H. H.: J. Physiol. 1933, 80, 10.  
 DALE, H. H. und FELDBERG, W.: J. Physiol. 1934, 81, 320.  
 DANIELOPOLU, D. und ASLAN, A.: Compt. rend. Soc. de biol. 1925, 92, 285.  
 DANIELOPOLU, D. und ASLAN, A.: J. de Physiol. et de path. gén. 1925, 23, 572.  
 DETRE, L. und SIVÓ, R.: Ztschr. f. d. ges. exper. Med. 1925, 46, 594.  
 DOBBS, R. H.: Lancet 1939, 236, 12.  
 DOMENJOZ, R.: Acta physiol. Scandinav. 1940, 1, 339.  
 DUENSING, F.: Klin. Wchnschr. 1938, 17, 1550.  
 EHRENREICH, S. und RIESENFELD, M.: Ztschr. f. Kinderh. 1921, 28, 55.  
 EISLEB, O. und SCHAUMANN, O.: Deutsche med. Wchnschr. 1939, 967.  
 EMMELIN, N.: Acta physiol. Scandinav. 1941, 2, 289.  
 EMMELIN, N., KAHLSON, G. S. und LINDSTRÖM, K.: Acta physiol. Scandinav. 1941, 3, 39.  
 ENGELHART, E.: J. Physiol. 1931, 227, 220.  
 ERBE, W.: Inauguraldiss. München 1903.  
 FEDDERSEN, H.: Inauguraldiss. Berlin 1884, zit. n. Lewin und Guillery.  
 FROMHERZ, K.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. 1933, 173, 86.  
 FRÄNKEL, S.: Die Arzneimittelsynthese, Berlin 1921.  
 GADAMER, J.: Arch. Pharmaz. 1901, 239, 302.  
 GALLENGER, R.: Arch. internat. de pharmacodyn. et de thérap. 1930, 37, 87.  
 GEIGER, P. und HESSE, H.: Liebigs Ann. 1833, 5, 43.  
 GIBBS, O. S. und SZELÖCZEY, J.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. 1932, 168, 64.  
 GRAHAM, J. D. P. und LAZARUS, S.: J. Pharmacol. a. exper. Therap. 1940, 70, 165.  
 GRAY, S.: Am. J. Physiol. 1937, 120, 657.  
 GRAY, S. und BACHRACH, W. H.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 1940, 43, 36.  
 GREMELS, H.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. 1936, 182, 1.  
 GROLLMAN, A.: The cardiac output of man in health and disease, London 1932.  
 GRUBE, E.: Inauguraldiss. Göttingen 1905.  
 HAFERKORN, M. und LENDLE, L.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. 1933, 171, 276.



- HARRIES, C.: Liebig's Ann. 1897, 296, 328.
- HARRIS, J.: Lancet 1921, 200, 1072.
- HARRISON, T. R., BLALOCK, A., PILCHER, C. und WILSON, C. P.: J. Physiol. 1927, 83, 284.
- HEIDENHAIN, R.: Arch. f. d. ges. Physiol. 1872, 5, 309.
- HENDERSON, V. E.: J. Pharmacol. a. Exper. Therap. 1923, 21, 99.
- HENDERSON, V. E. und ROEPKE, M. H.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. 1933, 172, 314.
- HERRIN, R. C.: Am. J. Physiol. 1936, 115, 104.
- HERXHEIMER, H.: München. med. Wchnschr. 1921, 48, 1515.
- HESS, C.: Arch. f. Augenheilk. 1915—16, 80, 213.
- HESSE, H.: Liebig's Ann. 1891, 261, 87.
- LE HEUX, J. W.: Arch. f. d. ges. Physiol. 1918, 173, 8.
- LE HEUX, J. W.: Arch. f. d. ges. Physiol. 1920, 179, 177.
- HUSS, H.: Råd och upplysningar rörande beredning av sterila läkemedel, Stockholm 1941.
- IHRE, B.: Acta med. Scandinav. 1938, Suppl. 95.
- v. ISSEKUTZ, B.: Ztschr. f. exper. Path. u. Therap. 1917, 19, 99.
- IVY, A. C., LIM, K. S. und MCCARTHY, J. E.: Quart. J. Exper. Physiol. 1925, 15, 55.
- JOACHIMOGLU, G.: Berliner klin. Wchnschr. 1915, 52, 911.
- JENDRASSIK, L. und WILL, G.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. 1930, 153, 175.
- JOWETT, H. A. D. und PYMAN, F. L.: Trans. Roy. Soc. London 1909, 95, 1020.
- KALK, H.: Arch. f. Verdauungskr. 1923, 32, 219.
- KALK, H. und SIEBERT, P.: Arch. f. Verdauungskr. 1927, 40, 313.
- KEEFER, G. S. und BLOOMFIELD, A. L.: Arch. int. Med. 1926, 38, 203.
- KEETON, R. W., LUCKHARDT, A. B. und KOCH, F. C.: Am. J. Physiol. 1920, 51, 469.
- KURÉ, K. und Mitarbeiter: Arch. f. d. ges. Physiol. 1928, 218, 573 und 1936, 237, 40.
- KEUCHEL, P., Inauguraldiss. Dorpat 1868, zit. n. Pfankuch.
- KOBERT, R.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. 1887, 22, 396.
- KOBERT, R.: Riedels Berichte 1905, zit. n. Pfankuch.
- KOCHMANN, M.: Arch. internat. de pharmacodyn. et de therap. 1904, 12, 99.
- KOPPANYI, T. und LIEBERSON, A.: J. Pharmacol. a. Exper. Therap. 1930, 39, 187.
- KOSKOWSKI, W.: Arch. internat. de physiol. 1921—22, 17, 344.
- KRASNOGORSKI, N. J.: Acta paediat. 1930, 11, 481.
- KRAUT, K.: Liebig's Ann. 1863, 128, 280.
- KREITMAIR, H.: Mercks Jahresbericht 1938, 52, 46.

- KREITMAIR, H. und WOLFES, O.: Klin. Wchnschr. 1938, 17, 1547.
- KROGH, A.: Skandinav. Arch. f. Physiol. 1912, 27, 126.
- KUHN, A. und SCHÄFER, G.: Deutsch. Apoth. Ztg. 1938, 405 und 424.
- KÜSSNER, W.: Mercks Jahresbericht 1938, 52, 39.
- LADENBURG, A.: Ber. deutsch. chem. Ges. 1879, 12, 941.
- LADENBURG, A.: Liebigs Ann. 1882, 206, 74, zit. n. Pfankuch.
- LADENBURG, A.: Liebigs Ann. 1883, 217, 82.
- LANGLEY, J. N.: Schäfers Textbook of Physiology 1898, 1, 513.
- LANGLEY, J. N.: J. Physiol. 1905, 33, 374.
- LEE, P. H. und KIM, M. S.: J. Severance Union Med. Coll. 1937, 3, 71, zit. n. Chemical Abstracts 1937, 31, 6735.
- LEVIERATOS, S. G. und TSELIOS, P. A.: Arch. f. Verdauungskr. 1936, 59, 313.
- LEWIN, L. und GUILLERY, H.: Die Wirkungen von Arzneimitteln und Giften auf das Auge, Berlin 1905, Bd I, 162.
- VAN LIDTH DE JEUDE, A. P.: Arch. f. d. ges. Physiol. 1918, 170, 523.
- LILJESTRAND, G.: Arch. f. d. ges. Physiol. 1919, 175, 111.
- LILJESTRAND, G. und ZANDER, E.: Ztschr. f. d. ges. exper. Med. 1928, 59, 105.
- LIM, K. S., MATHESON, A. R. und SCHLAPP, W.: Quart. J. Exper. Physiol. 1923, 13, 333.
- LISSÁK, K. und MARTIN, J.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. 1940, 196, 558.
- LOCKWOOD, B. C. und CHAMBERLIN, H. G.: Arch. int. Med. 1922, 30, 806.
- LOEWI, O.: Arch. f. d. ges. Physiol. 1921, 189, 239.
- LOEWI, O. und NAVRATIL, E.: Arch. f. d. ges. Physiol. 1924, 206, 123.
- LOEWI, O. und NAVRATIL, E.: Arch. f. d. ges. Physiol. 1926, 214, 687.
- MARSHALL, E. K.: J. Pharmacol. a. Exper. Therap. 1926, 39, 167.
- MC GUIGAN, H.: J. A. M. A. 1921, 76, 1338.
- MEIER, R.: Klin. Wchnschr. 1936, 15, 1405.
- MEIN, zit. n. Pfankuch.
- MICHELSON, V. und NEUMARK, J. E.: Arch. f. Verdauungskr. 1926, 39, 275.
- MOLNÁR, B.: Deutsch. med. Wchnschr. 1909, 35, 754.
- MOMMSEN, H.: Monatschr. f. Kinderh. 1927, 36, 239.
- MORAT, J.-P. und DOYON, M.: Compt. rend. Soc. de biol. 1892, 44, 643.
- MÜLLER, E.: Inauguraldiss. Dorpat 1891, zit. n. Pfankuch.
- MØLLER, K. O.: Farmakologi, Kopenhagen 1941.
- NICHOLSON, D.: J. Pharmacol. a. Exper. Therap. 1926, 28, 77.

- NETSCHAJEW, A. A.: Inauguraldiss. S:t Petersburg 1882, zit. n. Babkin.
- ODAIRA, T.: Tohoku J. Exper. Med. 1925, 6, 325.
- OELKERS, H. A., RAETZ W. und RINTELEN, K.: Arch. Pharmaz. 1932, 270, 520.
- v. OETTINGEN, W. F.: Heffters Hbd d. exper. Pharmakol. Ergänzungswerk 1937, 3, 1.
- v. OETTINGEN, W. F. und MARSHALL, I. H.: J. Pharmacol. a. Exper. Therap. 1934, 50, 15.
- OKADA, S., KURAMACHI, K., TSUKAHARA, T. und OGINOUE, T.: Arch. int. Med. 1929, 43, 446.
- PASKIND, H. A.: J. Clin. Med. 1921, 7, 104.
- PFANKUCH, E.: Houbens Fortschritte der Heilstoffchemie, 2 Abt. III. Bd, Berlin 1939, 323.
- PICK, F.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. 1899, 42, 399.
- PLATZ, O.: Ztschr. f. klin. Med. 1922, 28, 81.
- PLAVSIC, C.: Arch. d. malad. du coeur, 1939, 32, 163.
- POLLAND, W. S.: J. Clin. Investigation 1930, 9, 319.
- POLONOWSKI, M. und M.: Compt. rend. Acad. de Sc. 1925, 180, 877 und 1755.
- POOS, F.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. 1927, 126, 337.
- POPIELSKI, L.: Arch. f. d. ges. Physiol. 1920, 178, 214.
- PORTER, R. T.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 1932, 29, 504.
- PULEWKA, P.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. 1932, 168, 307.
- PYMAN, F.: J. Chem. Soc. London 1917, 111, 1103.
- REHFUSS, M. G.: Trans. Am. Gastroenterol. Ass. 1918, 25.
- REIN, H.: Verhandl. deutsch. Ges. inn. Med. 1931, 247.
- RIEGEL, A.: Ztschr. klin. Med. 1899, 37, 381.
- ROHOLM, K.: Acta med. Scandinav. 1930, 73, 472.
- ROTHLIN, E.: Arch. f. d. ges. Physiol. 1924, 206, 614.
- ROTHLIN, E. und GUNDLACH, G.: Arch. internat. de physiol. 1921, 17, 59.
- RUDOLF, R. D. und BULMER, F. M.: Am. J. M. Sc. 1924, 168, 641.
- DE RUITER: Nederlandsch Lancet, 1853, 3, 433, zit. n. Lewin und Guillery.
- RYLANT, P. und DEMOOR, J.: Compt. rend. Soc. de biol. 1927, 96, 204.
- SANOZKI, A.: Inauguraldiss. S:t Petersburg 1893, zit. n. Babkin.
- SCHAUMANN, O.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. 1940, 196, 109.
- SCHIFF, A.: Arch. f. Verdauungskrr. 1900, 6, 107.
- SCHLEMMER, F. und TÖRBER, C.: Deutsch. Apoth. Ztg 1938, zit. n. Huss.
- v. SCHROFF, K. D., FRÖHLICH, D. und LICHTENFELS, G.: Ztschr. Ges. Ärzte Wien 1852, 1, 211, zit. n. Pfankuch.

- SEGERDAHL, E.: Acta med. Scandinav. 1934, 83, 278.
- SJÖSTRAND, T.: Skandinav. Arch. f. Physiol. 1935, 71 Suppl.
- SMITH, W. C., BURWELL, S. und DE VITO, M. J.: J. Clin. Investigation 1928, 6, 237.
- STICH, C.: Bakteriologie, Serologie und Sterilisation im Apothekenbetriebe, Berlin 1938, zit. n. Huss.
- STRAUB, W. und MUÑOZ FERNANDEZ, E.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. 1933, 170, 26.
- STURGIS, C. C., WEARN, J. T. und TOMPKINS, E. H.: Am. J. M. Sc. 1924, 168, 641.
- TENNENBAUM, M.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. 1930, 184, 325.
- TEORELL, T.: Skandinav. Arch. f. Physiol. 1933, 66, 225.
- TODA, K.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. 1929, 146, 313.
- TRENDELENBURG, P.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. 1913, 73, 118.
- TRIER, G.: Die Alkaloide, Berlin 1931.
- USCHAKOW, W. G.: Inauguraldiss. St Petersburg 1896, zit. n. Babkin.
- VINCKE, E. und OELKERS, H. A.: Med. Klin. 1937, 33, 80.
- VINEBERG, A. M. und BABKIN, B. P.: Am. J. Physiol. 1931, 97, 69.
- VÖLCKERS und HENSEN: Zentralblatt med. Wissensch. 1866, zit. n. Pfankuch.
- WEBER: Zentralblatt med. Wissensch. 1876, 14, 769, zit. n. Pfankuch.
- WIGGERS, C. J.: Physiology in health and disease, Philadelphia 1934.
- WILLSTÄTTER, R. und BERNER, E.: Ber. deutsch. chem. Ges. 1923, 56, 1079.
- ZELIONY, G. P. und SAWITSCH, W. W.: Verhandl. Ges. russ. Ärzte zu Petersburg, 1911, zit. n. Babkin.